Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Análisis de las bases moleculares de la resistencia a la quimioterapia y estrategias para su optimización: rol de las proteínas ABC, la apoptosis y la transformación celular

Castronuovo, Cynthia Celeste

2015-05-21

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Castronuovo, Cynthia Celeste. (2015-05-21). Análisis de las bases moleculares de la resistencia a la quimioterapia y estrategias para su optimización: rol de las proteínas ABC, la apoptosis y la transformación celular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Castronuovo, Cynthia Celeste. "Análisis de las bases moleculares de la resistencia a la quimioterapia y estrategias para su optimización: rol de las proteínas ABC, la apoptosis y la transformación celular". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-05-21.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Análisis de las bases moleculares de la resistencia a la quimioterapia y estrategias para su optimización: rol de las proteínas ABC, la apoptosis y la transformación celular

Tesis presentada para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el Área de Química Biológica

Cynthia Celeste Castronuovo

Director de tesis: Dra. Alicia Susana Lorenti

Director Asistente: Dra. Verónica Lidia Mathet

Consejero de Estudios: Dra. Elba Susana Vázquez

Laboratorio de Hepatitis Virales. Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM), Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

Buenos Aires, 2015

Fecha de defensa: 21/05/2015

RESUMEN

Análisis de las Bases Moleculares de la Resistencia a la Quimioterapia y Estrategias para su Optimización: Rol de las Proteínas ABC en la Apoptosis y la Transformación Celular

El objetivo principal de esta tesis doctoral fue contribuir a la búsqueda de soluciones más eficaces para el tratamiento de diferentes enfermedades hepáticas como la hepatitis crónica causada por el HBV y el HCC. Los resultados más relevantes son: A) diferentes co-polímeros de PEO-PPO produjeron una reducción en la expresión de BCRP –bomba transportadora de drogas, entre otros compuestos- y un aumento en la acumulación intracelular del antitumoral doxorrubicina, en líneas celulares derivadas de HCC. La sensibilidad a la doxorrubicina se incrementó hasta 41 veces, lo cual muestra una posible capacidad de los mismos de quimiosensibilizar células MDR. B) estos co-polímeros indujeron apoptosis y un aumento en los niveles de ARNm de *bax* y *h-tert*. C) uno de los análogos nucleosídicos estudiados presentó actividad anti-HBV. D) uno de los co-polímeros analizados redujo la replicación del HBV. E) la proteína X del HBV (HBx) -salvaje o mutante (I127T/K130M/V131I)- presentó efectos pro y anti-apoptóticos. F) HBx y la replicación de HBV en su conjunto aumentaron la expresión de diversas proteínas -MRP1, MDR1 y BCRP- involucrados en el transporte de drogas antivirales y anticancerosas.

Estos resultados en conjunto tendrían potenciales nuevas implicancias en la oncogénesis hepática y en la terapéutica antiviral y anticancerosa.

Palabras claves: HCC, Co-polímeros, HBV, HBx, Apoptosis, ABC, MDR.

ABSTRACT

Analysis of the Molecular Basis of Chemotherapy Resistance and Strategies for its Optimization: Role of ABC Proteins in Apoptosis and Cell Transformation

The main objective of this thesis was to contribute to the discovery of more effective treatments of various liver diseases such as chronic hepatitis caused by HBV and HCC. The most important results are the following: A) Different PEO-PPO co-polymers produced a reduction in the expression of BCRP -drug pump transporter, among other compounds-, and an increased intracellular accumulation of the antitumor doxorubicin, in cell lines derived from HCC. Doxorubicin sensitivity increased to 41 times, which shows a possible ability of co-polymers to chemosensitisation MDR cells. B) These co-polymers induced apoptosis and increased mRNA levels of *bax* and *h-tert*. C) One of the nucleoside analogues studied herein had anti-HBV activity. D) One of the co-polymers analyzed decreased HBV replication. E) The HBV X protein (HBx) -wild type or mutant (I127T/K130M/V131I)- had pro and anti-apoptotic effects. F) HBx and HBV replication as a whole increased expression of various proteins -MDR1, MRP1 and BCRP- involved in the transport of antiviral and anticancer drugs.

These results together would have potential new implications in hepatic oncogenesis and in antiviral and anticancer therapeutics.

Key words: HCC, Co-polymers, HBV, HBx, Apoptosis, ABC, MDR.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por darme la oportunidad de poder realizar esta tesis de Doctorado.

Al CONICET por haberme brindado financiamiento para este trabajo de investigación.

Mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que durante todos estos años han estado de algún modo a mi lado, familia, amigos y compañeros y que de una u otra forma contribuyeron a que esta tesis llegue a su fin.

Agradezco a mi directora Alicia Lorenti por haberme elegido y confiar siempre en mí, por apoyarme, por animarme y alentarme en cada una de estas etapas por las que fui atravesando hasta llegar a este momento.

Quiero agradecer muy especialmente a mi co-directora Verónica Mathet, por haberme aceptado en su grupo de investigación, por confiar en mí sin conocerme y por haberme dado la oportunidad de poder terminar con mi doctorado. Gracias por toda la dedicación y exigencia que hicieron que esta tesis sea lo que es!

A mi gran compañera y amiga Luján, que sin ella todo esto hubiera sido casi imposible de lograr; por las incontables horas de trabajo juntas, por demostrarme que siempre se puede y por haber estado constantemente preocupada por mí para que yo pudiera lograr esta meta.

A toda la gente del labo de Hepatitis Virales: al Dr. José Oubiña, Ana, Amy, Emi y Ceci; que compartieron muchas horas de trabajo conmigo y me dieron infinitas manos cuando los necesité. También gracias a Uds. esta tesis pudo llegar a su fin.

Agradezco al Dr. Luis Parada, que en el inicio de mi tesis doctoral me brindó la posibilidad de conocer el fantástico mundo de la citogenética, por sus conocimientos, por su paciencia y aún hoy por brindarme su ayuda y darme consejos que me ayudan a mejorar en lo profesional.

A mis dos amigas de toda la vida, Georgi y Lore, que a pesar de vernos muy poco siempre están ahí acompañándome en todo.

A toda mi familia, por su eterna entrega y capacidad de mantenerme la ilusión de que esta meta la iba a alcanzar, y que me enseñaron que con paciencia y perseverancia se puede llegar muy lejos. Gracias por apoyarme en todas y cada una de mis decisiones. Muy especialmente quiero agradecer a mi abuela Chichí que desde que me recibí dijo: "ojalá pudiera llegar a disfrutar este momento"…y con sus 90 años, hoy está acá compartiendo este gran logro conmigo! Sos un gran ejemplo de vida!

Finalmente, quiero agradecer a mis dos grandes amores, Diego y Bauti. A Diego, porque gracias a todo su amor, paciencia y su apoyo incondicional pude sacar todas mis fuerzas y luchar día a día para alcanzar este objetivo. Creo que sin él a mi lado, este último tiempo hubiera sido imposible de sobrellevar. Y a la cosita más linda de mi vida, Bauti, que me acompañó en esta última etapa, siempre con esas sonrisas, besos y abrazos que me cargaron de pilas para poder seguir!!!

Gracias!

A mis dos amores,
Bautista y Diego

PUBLICACIONES Y PREMIOS

Los contenidos de este trabajo de tesis forman parte de las siguientes publicaciones y premios:

Publicaciones

- **Castronuovo CC**, Cuestas ML, Oubiña JR, Mathet VL. Effect of several PEO-PPO amphiphiles on bax, bcl-2 y h-tert mRNAs: and insight into apoptosis and cell immortalization induced in hepatoma cells by these polymeric excipients. Biotechnol Appl Biochem (2015)

- María L Cuestas, **Cynthia C Castronuovo**, José R Oubiña, Verónica L Mathet. Hepatitis B virus protein and its effect on cell proliferation, immortalization and apoptosis. Ann Hepatol. (En revisión 2015)

Premios

- Premio 2013 *"Dr. José Francisco Zelasco" "A la excelencia en Investigación Básica en Hepatología"* otorgado por la Asociación Argentina para el Estudio de las Enfermedades del Hígado (AAEEH)

ABREVIATURAS

5-FU	5-fluorouracilo
ABC	*cassette* de unión al ATP
ADN	ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNccc	ADN circular covalentemente cerrado
AEBSF	amino-etil-benceno-sulfonil-fluorhídrico
AKT	proteína quinasa B (también conocida como PKB)
ALT (TGP)	alanina aminotransferasa
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ANs	análogos de nucleót(s)idos
AP-1	proteína activadora-1
APS	persulfato de amonio
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
AST (TGO)	aspartato aminotransferasa
ATF/CREB	factor activador de la transcripción/proteínas de unión a los elementos de respuesta de AMPc
ATP	adenosina trifosfato
Bad	promotor de muerte asociado a Bcl-2
Bax	proteína X asociada a Bcl-2
Bcl-2	proteína 2 de linfoma de células B
BCLC	*Barcelona Clinic Liver Cancer*
BCRP	proteína relacionada al cáncer de mama
BHL	balance hidrofílico-lipofílico
BRCA2	proteína susceptible al cáncer de mama tipo 2
BSA	seroalbúmina bovina
C/EBP	proteínas de unión al potenciador transcripcional CCAAT
CD135	*cluster* de antígeno de diferenciación
CDC27	proteína del ciclo de división celular 27
CGH	hibridación genómica comparativa
c.s.p	cantidad suficiente para
CMV	citomegalovirus
c-Myc	oncogén homólogo a la mielocitomatosis viral
Ct	ciclo umbral
$DiOC_2$	ioduro de 3,3'-dietiloxacarbocianina
DISC	complejo de señalización inductor de muerte
DMEM	medio de Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
dN6	hexámeros aleatorios
dNTPs	deoxinucleótido trifosfato
DO	densidad óptica
DTT	ditiotreitol
E2F	factor de transcripción E2F
ECL	quimioluminiscencia aumentada
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético
EGF	factor de crecimiento epidermal
ERK	quinasa reguladora de la señal extracelular

FDA	admnistración federal de drogas
FGF	factor de crecimiento fibroblástico
FITC	isotiocianato de fluoresceína
GRAS	generalmente reconocido como seguro
GSH/GST	glutation oxidado/glutation reducido
GST	genes supresores tumorales
h	hora
HAI	hepatitis autoinmune
HBeAg	antígeno “e” del HBV
HBsAg	antígeno de superficie del HBV
HBV	virus hepatitis B
HBx	proteína X de la hepatitis B
HCC	hepatocarcinoma celular
HCV	virus de hepatitis C
HDGF	factor de crecimiento derivado de hepatocitos
HEPES	4-(2-hidroxietil)-1-piperazina etanosulfónico
HIF-1α	factor inducible por hipoxia 1α
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana
HNF1	factor nuclear 1 de hepatocitos
HOX	genes *homeobox*
HRP	peroxidasa de rábano
h-TERT	telomerasa humana
IAP	proteína inhibidora de la apoptosis
IC_{50}	concentración inhibitoria 50
IFCC	federación internacional de química clínica
IFN-α	interferón α
IL-12	interleuquina 12
IP	ioduro de propidio
JAK/STAT	quinasa Janus/transductores de señales y activadores de la transcripción
LB	luria bertoni
LOH	pérdida de heterocigosis
LTreg	linfocitos T regulatorios
M6P/IGF-IIR	receptor de manosa 6 fosfato/factor de crecimiento tipo II de insulina
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
MC	medio completo
MDM2	*murine doble minute 2*
MDR	resistencia a múltiples drogas
MDR1	proteína resistente a múltiples drogas 1
MEK	quinasa MAPK/ERK
mg	miligramo
ml	mililitro
min	minuto
MMLV	transcriptasa inversa proveniente del virus de leucemia murina de Moloney
MRP1	proteína relacionada con MDR 1
mTOR	blanco de rapamicina en células de mamífero
MTS/PMS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium/phenazine methosulfate
mut	mutado

NASH	esteatohepatitis no alcohólica
NBD	dominio de unión a nucleótido
NF-κB	factor nuclear-κB
NK	células naturales asesinas
NRTI	nucleót(s)idos inhibidores de la transcriptasa inversa
ON	toda la noche
ORF	marco abierto de lectura
PARP	poli-ADP-ribosiltransferasa
pb	pares de bases
PBS	fosfato *buffer* salino
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PDGF	factor de crecimiento derivado de plaquetas
PEG	polietilenglicol
PEG-IFN-α	IFN-α pegilado
PEO	poli(óxido) de etileno
P-gp	glicoproteína P
PI3K	fosfatidil inositol 3 quinasa
PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluorhídrico
PPO	poli(óxido) de propileno
PRLTS	supresor tumoral como el receptor PDGF beta
Primers	oligos
PS	fosfatidilserina
PTEN	homólogo de fosfatasa y tensina
PVDF	difluoruro de polivinileno
qPCR	reacción en cadena de la polimerasa (PCR) cuantitativa, en tiempo real
RAF	fibrosarcoma acelerado rápidamente
Rb1	proteína de retinoblastoma 1
RFLP	polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción
Rho123	rodamina 123
ROS	especies reactivas de oxígeno
rpm	revoluciones por minuto
RT	transcripción inversa
RT-qPCR	transcripción inversa seguida de PCR cuantitativa, en tiempo real
sal	salvaje
SD	desvío estándar
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poli-acrilamida con SDS
SFB	suero fetal bovino
Smac	segundo activador de caspasas derivado de la mitocondria
TAE	solución de tris, ácido acético y EDTA
TBE	tris borato EDTA
TBS	solución *buffer* conteniendo tris
TBS-T	TBS-tween
TEMED	tetrametilenetilendiamina
TGF-β	factor de crecimiento tumoral β
TMD	dominio transmembrana
TNF-α	factor de necrosis tumoral α
TOP2A	topoisomerasa 2 alfa
TRAF	factor asociado al receptor del factor de necrosis tumoral

TRF1	factor de unión a las repeticiones teloméricas tipo 1
TUBG1	proteína tubulina gamma 1
UV	ultravioleta
VEGF	factor de crecimiento endotelial vascular
WB	*western blot*
µl	microlitro
$\Delta\Psi_m$	potencial de membrana mitocondrial

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN

I. HEPATOCARCINOMA 18

I.1. Etiología y epidemiología del HCC 16

I.2. Factores de riesgo 20

I.3. Mecanismos moleculares implicados en el HCC 21

I.3.1. Vías de señalización involucradas en la apoptosis 23

I.3.2. Vías de señalización involucradas en la supervivencia/proliferación 26

I.4. Terapéutica del HCC 29

II. VIRUS HEPATITIS B (HBV) Y HCC 36

II.1. HBV 36

II.1.1. Características del virus 36

II.2. Mecanismos moleculares que promueven el HCC por parte del HBV 38

II.2.1. Proteína X del HBV (HBx) 39

II.3. Tratamiento anti-HBV 41

III. TRANSPORTADORES ABC 45

III.1. Generalidades 45

III.2. Proteínas ABC involucradas en resistencia a múltiples drogas (MDR) 48

III.2.1. MDR1 (*Multidrug Resistance 1*) 48

III.2.2. MRP1 (*MDR Related Protein 1*) 50

III.2.3. BCRP (*Breast Cancer Resistant Protein*) 52

III.3. Estrategias para revertir el fenotipo MDR 54

IV. POLOXAMINAS Y POLOXÁMEROS 58

IV.1. Características generales 58

IV.2. Aplicaciones biomédicas y biofarmacéuticas de los co-polímeros de PEO-PPO 61

OBJETIVOS

I. Objetivos generales 64

II. Objetivos específicos 64

MATERIALES Y METODOLOGÍA

MATERIALES

I. CULTIVO DE CÉLULAS 67

I.1. Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares 67

I.2. Criopreservación de las líneas celulares 67

II. CO-POLÍMEROS DE PEO-PPO 68

III. ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS 68

METODOLOGÍA

I. DESARROLLO DE ESTRATEGIAS TECNOLÓGICAS TENDIENTES A OPTIMIZAR LA TERAPÉUTICA ANTI-HCC Y ANTI-HBV

I.1. *Estudiar el efecto de compuestos con potencial acción inhibitoria sobre BCRP en líneas celulares derivadas de HCC humano, en particular determinar la acción de co-polímeros que se utilizan en la formulación de fármacos antitumorales y antivirales* 71

I.1.1. Ensayos de citotoxicidad 71

I.1.2. Efecto de los co-polímeros sobre BCRP 72

I.1.2.A. Estudio de los niveles de expresión de BCRP por *Western blot* (WB) 72

I.1.2.A.1. Aislamiento y cuantificación de proteínas totales 72

I.1.2.A.2. SDS-PAGE (Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes) y WB 73

I.1.2.B. Análisis del nivel de ARNm de *bcrp* por RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR) 74

I.1.2.B.1. Extracción de ARN 74

I.1.2.B.2. Síntesis de ADNc 75

I.1.2.B.3. qPCR 76

I.1.2.C. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi m$) 77

I.2. *Desarrollar estrategias tendientes a optimizar la terapéutica anti-HCC mediante el diseño de formulaciones droga/co-polímero que logren obtener la concentración de droga intracelular suficiente para mejorar su eficacia* 78

I.2.1. Determinación del Índice de Reversión a la Resistencia (IRR) 79

I.2.1.A. Cálculo de la IC_{50} de la doxorrubicina y de la doxorrubicina en presencia de diferentes co-polímeros de PEO-PPO 79

I.3. *Desarrollar estrategias tendientes a optimizar la terapéutica anti-HBV mediante el estudio de diferentes análogos de nucleósidos producidos por síntesis química en nuestro país y de co-polímeros de PEO-PPO en el contexto de un sistema in vitro de replicación del HBV* 80

I.3.1. Estudio de la actividad antiviral de diferentes análogos de nucleósidos producidos por síntesis química 80

I.3.2. Estudio de la actividad antiviral de co-polímeros de PEO-PPO 81

II. ESTUDIO DE LOS EFECTOS FARMACOGENÓMICOS Y/O TOXICOGENÓMICOS DE MATERIALES POLIMÉRICOS EMPLEADOS EN LA FORMULACIÓN DE DROGAS ANTITUMORALES Y ANTIVIRALES

II.1. *Estudiar el efecto de co-polímeros que se emplean en la formulación de drogas antitumorales en la apoptosis e inmortalización celular* 83

II.1.1. Ensayos de apoptosis 83

II.1.1.A. Determinación de la apoptosis por AnexinaV-FITC/IP 83

II.1.1.B. Determinación de la hipodiploidía por IP 85

II.1.2. RT-PCR *Multiplex* 86

III. ANÁLISIS DEL ROL DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA X DEL HBV EN LA REGULACIÓN DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA, LA PROLIFERACIÓN Y LA INMORTALIZACIÓN CELULAR

III.1. *Estudiar comparativamente los efectos de la expresión de la proteína X salvaje y mutada del HBV sobre los niveles de ARNm de bax, bcl-2 y telomerasa (h-tert)*..... 89

III.2. *Estudiar comparativamente los efectos de la expresión de la proteína X salvaje y mutada del HBV sobre los niveles de expresión de diversas proteínas involucradas en la regulación de la apoptosis, proliferación e inmortalización celular como c-Myc, caspasa 3 y 9, c-IAP1, c-IAP2, tanquirasa y ganquirina* 90

III.3. *Evaluar comparativamente los efectos observados con los datos adquiridos en un sistema de replicación in vitro para HBV* 91

IV. APORTE DE NUEVOS CONOCIMIENTOS ACERCA DE LA PATOGÉNESIS MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR HBV ANALIZANDO EL ROL DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA X DEL VIRUS SOBRE ALGUNOS MIEMBROS DE LA SUPERFAMILIA ABC

IV.1. *Estudiar comparativamente los efectos de la expresión de la proteína X salvaje y mutada del HBV sobre los niveles de expresión de MDR1, MRP1 y BCRP* 93

IV.1.1. Análisis de los niveles de ARNm de *mdr1*, *mrp1* y *bcrp* por RT-qPCR 93

IV.1.2. Estudio de los niveles de expresión de proteínas MDR1, MRP1 y BCRP por WB 94

IV.2. *Evaluar comparativamente los efectos observados con los datos adquiridos en un sistema de replicación in vitro para HBV* 94

V. ANÁLISIS ESTADÍSTICO 95

RESULTADOS

I. DESARROLLO DE ESTRATEGIAS TECNOLÓGICAS TENDIENTES A OPTIMIZAR LA TERAPÉUTICA ANTI-HCC Y ANTI-HBV

I.1. *Estudiar el efecto de compuestos con potencial acción inhibitoria sobre BCRP en líneas celulares derivadas de HCC humano, en particular determinar la acción de co-polímeros que se utilizan en la formulación de fármacos antitumorales y antivirales* 99

I.1.1. Ensayos de citotoxicidad 99

I.1.2. Efecto de los co-polímeros sobre BCRP 100

I.1.2.A. Estudio de los niveles de expresión de BCRP por WB 100

I.1.2.B. Análisis del nivel de ARNm de *bcrp* por RT-qPCR 103

I.1.2.C. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) 105

I.2. *Desarrollar estrategias tendientes a optimizar la terapéutica anti-HCC mediante el diseño de formulaciones droga/co-polímero que logren obtener la concentración de droga intracelular suficiente para mejorar su eficacia* 108

I.2.1. Determinación del Índice de Reversión a la Resistencia (IRR) 108

I.2.1.A. Cálculo de la IC_{50} de la doxorrubicina y de la doxorrubicina en presencia de diferentes co-polímeros 108

I.3. *Desarrollar estrategias tendientes a optimizar la terapéutica anti-HBV mediante el estudio de diferentes análogos de nucleósidos producidos por síntesis química en nuestro país y de co-polímeros de PEO-PPO en el contexto de un sistema in vitro de replicación del HBV* 110

I.3.1. Estudio de la actividad antiviral de diferentes análogos de nucleósidos producidos por síntesis química 110

I.3.2. Estudio de la actividad antiviral de co-polímeros de PEO-PPO 111

II. ESTUDIO DE LOS EFECTOS FARMACOGENÓMICOS Y/O TOXICOGENÓMICOS DE MATERIALES POLIMÉRICOS EMPLEADOS EN LA FORMULACIÓN DE DROGAS ANTITUMORALES Y ANTIVIRALES

II.1. Estudiar el efecto de co-polímeros que se emplean en la formulación de drogas antitumorales en la apoptosis e inmortalización celular 114

II.1.1. Ensayos de apoptosis 114

II.1.1.A. Determinación de la apoptosis por Anexina V-FITC/IP 114

II.1.1.B. Determinación de la hipodiploidía por IP 117

II.1.2. Determinación de los niveles de ARNm de *bax*, *bcl-2* y *h-tert* por RT-PCR *Multiplex* 118

III. ANÁLISIS DEL ROL DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA X DEL HBV EN LA REGULACIÓN DE LA MUERTE CELULAR PROGRAMADA, LA PROLIFERACIÓN Y LA INMORTALIZACIÓN CELULAR

III.1. *Estudiar comparativamente los efectos de la expresión de la proteína X salvaje y mutada del HBV sobre los niveles de ARNm de bcl-2, bax y h-tert* 123

III.1.1. Expresión de la proteína X salvaje y mutada del HBV 123

III.1.2. Determinación de los niveles de ARNm de *bax*, *bcl-2* y *h-tert* por RT- PCR *Multiplex*..... 124

III.2. *Estudiar comparativamente los efectos de la expresión de la proteína X salvaje y mutada del HBV sobre los niveles de expresión de diversas proteínas involucradas en la regulación de la apoptosis, proliferación e inmortalización celular como c-Myc, caspasa 3 y 9, c-IAP1, c-IAP2, tanquirasa y ganquirina* 125

III.3. *Evaluar comparativamente los efectos observados con los datos adquiridos en un sistema de replicación in vitro para HBV*..... 126

IV. APORTE DE NUEVOS CONOCIMIENTOS ACERCA DE LA PATOGÉNESIS MOLECULAR DE LA INFECCIÓN POR HBV ANALIZANDO EL ROL DE LA EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA X DEL VIRUS SOBRE ALGUNOS MIEMBROS DE LA SUPERFAMILIA ABC

IV.1. *Estudiar comparativamente los efectos de la expresión de la proteína X salvaje y mutada del HBV sobre los niveles de expresión de MDR1, MRP1 y BCRP*..... 130

IV.1.1. Análisis de los niveles de ARNm de *mdr1*, *mrp1* y *bcrp* por RT-qPCR 130

IV.1.2. Estudio de los niveles de expresión de proteínas MDR1, MRP1 y BCRP por WB 130

IV.2. *Evaluar comparativamente los efectos observados con los datos adquiridos en un sistema de replicación in vitro para HBV* 133

DISCUSIÓN 136

CONCLUSIONES 147

PERSPECTIVAS 150

BIBLIOGRAFÍA 152

INTRODUCCIÓN

INTRODUCCIÓN

I. HEPATOCARCINOMA

I.1. Etiología y epidemiología del HCC

El hepatocarcinoma o carcinoma hepatocelular (HCC) es el cáncer primario más común de hígado y la tercera causa de muerte por cáncer en el mundo (Ferlay et al., 2010). La incidencia del HCC es muy variable dado que depende de la presencia de las diferentes enfermedades hepáticas subyacentes presentes en cada región (Bosch et al., 2004; Sherman, 2005). Según la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, *International Agency for Research on Cancer*), el HCC tiene una alta mortalidad en todo el mundo con una relación global de mortalidad/incidencia de 0,93 (Ferlay et al., 2010). Más del 80% de los casos se producen en países en vías de desarrollo que carecen de la infraestructura necesaria para el manejo de dicha enfermedad como África subsahariana, el sudeste asiático y Asia oriental (Ferlay et al., 2010). Sin embargo, en los últimos años, se observó un drástico aumento de la incidencia en algunos países desarrollados, incluidos Estados Unidos, Inglaterra y Francia (Rahman et al., 2013; Shiraha et al., 2013). Los países de América Latina, presentan riesgo intermedio (Gomaa et al., 2008) (Figura 1).

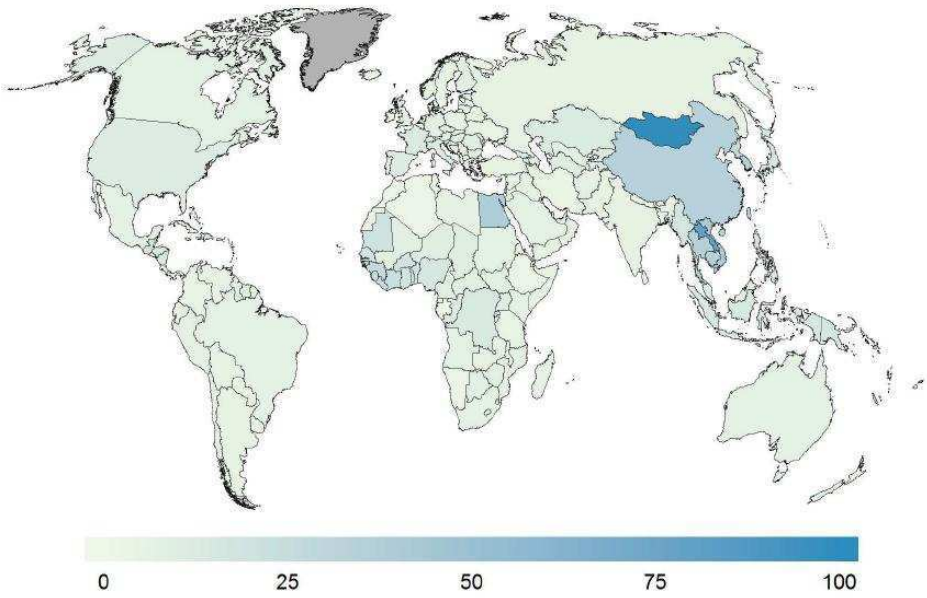
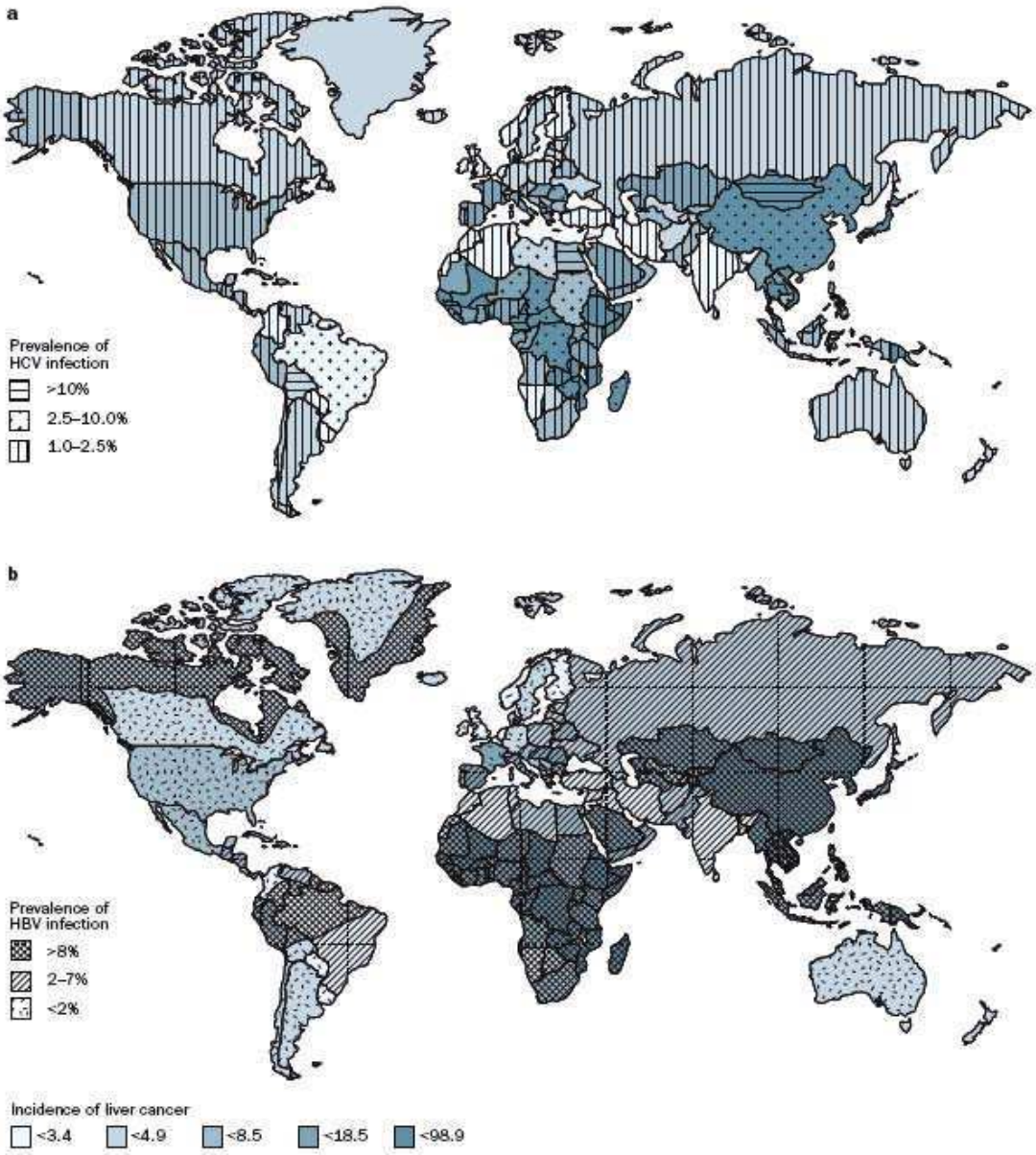


Figura 1: tasas de incidencia de HCC estandarizadas por edad, en hombres por cada 100.000 habitantes. Datos obtenidos de GLOBOCAN 2012, la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer, *World Health Organization* (http://globocan.iarc.fr/).

Las variaciones en las tasas globales de incidencia del HCC reflejan la variación de los factores de riesgo de esta enfermedad, que muestra que los países con una alta prevalencia de infecciones por el virus hepatitis B (HBV) o C (HCV), por lo general tienen una elevada incidencia de HCC (Figura 2). Esto es consistente con estudios que demuestran que alrededor de tres cuartas partes de los HCC se atribuyen a infección crónica por HBV o HCV (El-Serag y Rudolph, 2007).



(Yang y Roberts, 2010)

Figura 2: variación global de la incidencia del HCC, prevalencia de infección por HCV o HBV. Puede verse reflejado que los países con una alta prevalencia de HBV o HCV por lo general tienen una mayor incidencia de HCC.

En general, el riesgo de HCC es 2-7 veces mayor en hombres que en mujeres (Ferlay et al., 2010) dado que los hombres podrían tener tasas más elevadas de infecciones por HBV o HCV y, por otro lado, el efecto de los estrógenos podría suprimir la inflamación mediada por la interleuquina 6 (IL-6) en las mujeres, reduciendo tanto el daño hepático como la proliferación (Naugler et al., 2007). Por el contrario, los efectos de la testosterona podrían aumentar la señalización del receptor de andrógenos en hombres, promoviendo la proliferación de las células hepáticas (Sung et al., 2003; Chiu et al., 2007). De todos modos, recientemente se ha reportado que después de la menopausia no se observaron diferencias significativas entre los sexos (Cook et al., 2009).

I.2. Factores de riesgo

El HCC es una enfermedad compleja asociada con múltiples factores de riesgo y co-factores (Gomaa et al., 2008). La inflamación continua y el estrés oxidativo facilitan la acumulación de alteraciones genéticas en los hepatocitos. Como consecuencia de ello, en la mayoría de los pacientes el HCC es consecuencia de una cirrosis hepática pre-existente (Llovet, 2005), siendo las causas más comunes de la cirrosis la infección crónica por HBV o HCV. En efecto, se ha estimado que el HBV es responsable del 50% de los casos de HCC en todo el mundo, mientras que el 10-25% de los casos se cree que son por HCV (Block et al., 2003; Gurtsevitch, 2008).

En América Latina, se realizó un estudio prospectivo a fin de analizar la etiología de la enfermedad hepática crónica subyacente en pacientes con HCC. Según este estudio (Tabla 1), las principales causas etiológicas fueron HCV (30,8%), alcohol (20,4%), cirrosis criptogénica (14,6%), HBV (10,8%) y HCV + alcohol (5,8%) (Fassio et al., 2010).

Tabla 1: etiología de la enfermedad hepática crónica en 240 pacientes con diagnóstico de HCC en América Latina

Etiología	n	%
HCV	74	30,8
Alcohol	49	20,4
Cirrosis criptogénica	35	14,6
HBV	26	10,8
HCV + Alcohol	14	5,8
Otros	14	5,8
NASH	11	4,6
HBV + Alcohol	4	1,7
HAI	4	1,7
Hemocromatosis	4	1,7
HCV + HBV	2	0,8
Cirrosis primaria biliar	2	0,8
HCV + HBV + Alcohol	1	0,4

NASH: esteatohepatitis no alcohólica; HAI: hepatitis autoinmune

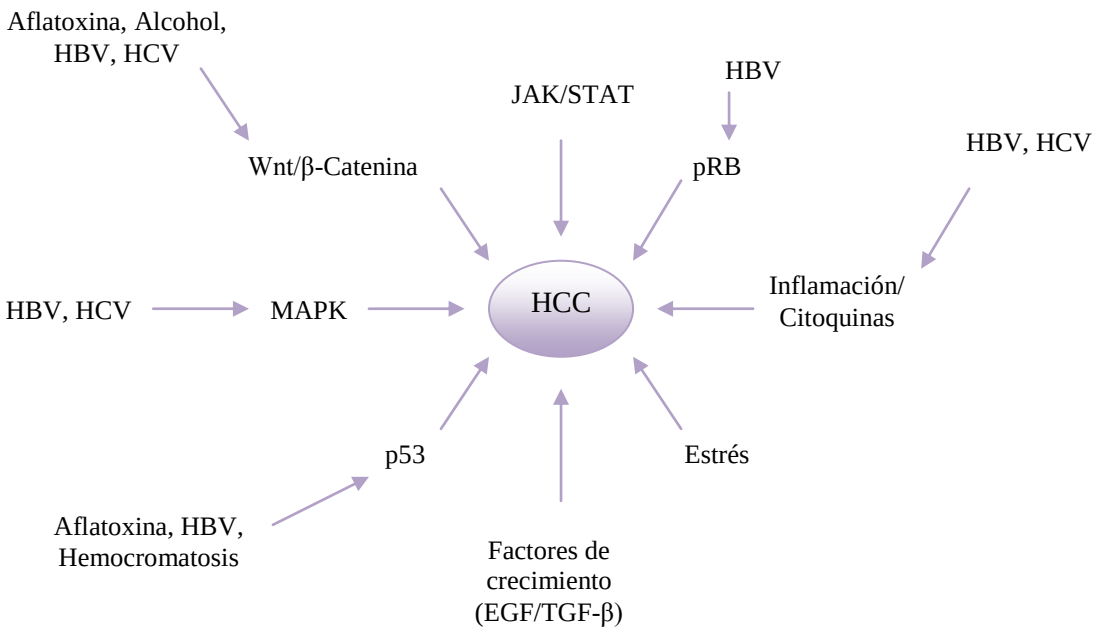
Otros factores de riesgo importantes son los tóxicos (alcohol, aflatoxinas), metabólicos (diabetes y enfermedad no alcohólica del hígado graso, hemocromatosis hereditaria) y aquellos factores asociados al sistema inmunológico (cirrosis biliar primaria y hepatitis autoinmune) (Parikh y Hyman, 2007).

I.3. Mecanismos moleculares implicados en el HCC

El HCC presenta una patogénesis molecular muy compleja y está asociado, entre otros factores, a alteraciones genómicas incluyendo inestabilidad cromosómica, metilación de promotores de genes, arreglos de ADN asociados a la integración del HBV, hipometilación del ADN y, en menor grado, a la inestabilidad de microsatélites (Herath et al., 2006). Estos cambios genéticos y epigenéticos ocurren durante la iniciación, promoción y progresión de la enfermedad (Teufel et al., 2007) y la acumulación de los mismos conduce a la desregulación de múltiples vías de señalización celular que incluyen la proliferación, la supervivencia, la diferenciación y la angiogénesis. El

análisis por citogenética convencional ha demostrado que anormalidades en los cromosomas 1, 6, 7, 8, 13, 17 y 20 son las más frecuentes en los tumores hepáticos (Parada et al., 1998; Midorikawa et al., 2006). Estudios moleculares de polimorfismos de microsatélites en HCCs han revelado la frecuente pérdida de heterocigosis (LOH, *Loss of heterozigocity*) en los cromosomas 1p, 4q, 5q, 6q, 8p, 13q, 16q, 17p y 22q, lo que sugiere que en estas zonas se encontrarían los genes supresores tumorales (GST). De acuerdo con estos datos, las mutaciones o deleciones de los GST M6P/IGF-IIR (6q27), PRLTS (8p21-22), BRCA2 (13q12), Rb1 (13q14) y p53 (17p13), se detectan con frecuencia en hepatomas (Buendia, 2000; Levy et al., 2002). Estudios de hibridación genómica comparativa (CGH, *Comparative Genome Hybridization*) muestran que el perfil genómico de los HCC se caracteriza por pérdidas de material genético en las regiones cromosómicas 1p, 4q, 6q, 8p, 13q, 16q y ganancias en 1q, 6p, 8q y 17q (Prange et al., 2003; Raidl et al., 2004), lo que confirma la importancia de las alteraciones genéticas como 14-3-3 zeta, PVT1 (8q22-24), S100A4 y HDGF (1q21-24) y TOP2A, CDC27 y TUBG1 (17q21) en el desarrollo del HCC (Taniguchi et al., 2002; Bengochea et al., 2008). Por otra parte, análisis transcriptómicos utilizando tecnología de alto rendimiento reveló que varios factores y co-factores transcripcionales se expresan de manera aberrante en los HCCs humanos. Muchos de ellos son factores claves en las vías de señalización que regulan procesos celulares pro-tumorigénicos, como la proliferación (c-Myc, β-Catenina, p53, HIF-1α, PTEN, E2F), la apoptosis (c-Myc, p53, E2F), la migración/invasión (β-Catenina, HOX) (Thorgeirsson y Grisham, 2002; Alves et al., 2011) y la angiogénesis (VEGF, PDGF, EGF) (Roberts y Gores, 2005; Thomas y Abbruzzese, 2005; Villanueva et al., 2007).

Las importantes modificaciones que ocurren en el tejido hepático -ya sea debido a la infección viral o a la exposición a agentes hepatotóxicos- causan cambios significativos en las vías de señalización celular y alteran la expresión de numerosos genes, resultando en la formación de tumores (Figura 3).



(Adaptado de Aravalli et al., 2008)

Figura 3: vías de señalización implicadas en el HCC. Se ha demostrado que algunas de ellas juegan un papel crítico en el desarrollo de este tipo de cáncer.

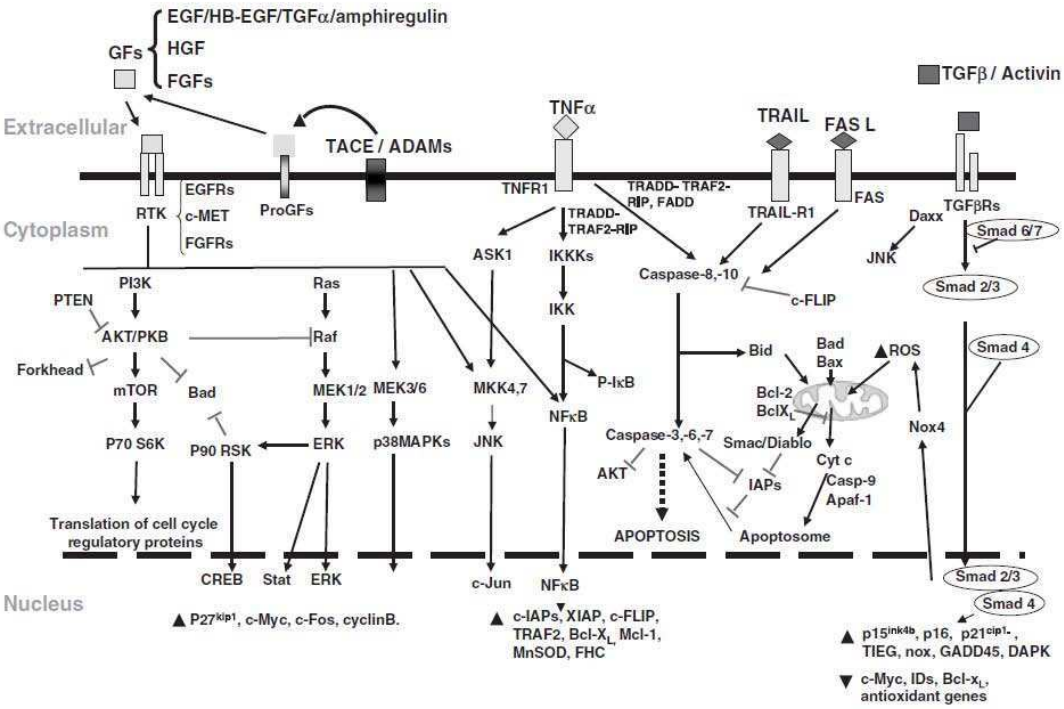
La desregulación del balance entre las vías de proliferación y la muerte celular representa un principio pro-tumorigénico en la carcinogénesis hepática (Fabregat et al., 2007), donde por lo general hay una activación de las cascadas de proliferación y una inhibición del proceso de muerte, lo que lleva a la supervivencia y proliferación de las células afectadas.

Sin embargo, todavía se conoce muy poco acerca de los mecanismos moleculares que conducen a la hepatocarcinogénesis. Estas vías son de gran interés desde el punto de vista terapéutico, debido a que se podría accionar sobre dichos mecanismos para reducir, retrasar o prevenir el proceso carcinogénico.

I.3.1. Vías de señalización involucradas en la apoptosis

La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico altamente conservado, que desempeña un papel importante en el mantenimiento de la homeostasis y control del crecimiento fisiológico durante el desarrollo y la remodelación tisular (Guicciardi y Gores, 2005). También se produce como un mecanismo de defensa, como ocurre en las reacciones inmunológicas o cuando las células resultan dañadas por una

determinada enfermedad o agentes nocivos (Norbury y Hickson, 2001). Dependiendo del tipo de estímulo, existen dos vías diferentes de apoptosis: la vía extrínseca (o vía de los receptores de muerte) y la vía intrínseca (o vía mitocondrial) (Figura 4). Ambas vías activan una variedad de proteasas -principalmente caspasas- y endonucleasas que finalmente degradan componentes celulares, conduciendo a cambios bioquímicos y morfológicos característicos de este tipo de muerte celular (Czerski y Nuñez, 2004). Además existe una vía adicional que implica la citotoxicidad mediada por linfocitos T e involucra a la perforina y granzimas A y B.



(Fabregat et al., 2007)

Figura 4: principales vías de señalización implicadas en el control de la apoptosis de los hepatocitos.

La vía extrínseca es regulada por una familia de receptores transmembrana conocidos como receptores de muerte, los cuales pertenecen a la superfamilia del factor de necrosis tumoral (TNF, *Tumor Necrosis Factor*) (Locksley et al., 2001). Los ligandos más conocidos y sus respectivos receptores incluyen a FasL/FasR, TNF-α/TNFR1, Apo3L/DR3, Apo2L/DR4 y Apo2L/DR5 (Suliman et al., 2001). La unión del ligando a su receptor induce la oligomerización del mismo. Esto lleva al reclutamiento de una proteína adaptadora que se asocia con las pro-caspasas 8 y 10, formando un complejo de

muerte conocido como DISC (*Death-inducing signaling complex*). En este complejo se produce la activación auto-catalítica de estas pro-caspasas, las cuales pueden activar directamente las caspasas ejecutoras (caspasas 3/-6/-7) de la apoptosis.
La vía intrínseca está mediada por diversos estímulos apoptóticos que convergen en la mitocondria, incluyendo la privación de factores de crecimiento, quimioterapia, radioterapia, hipoxia, estrés oxidativo y daño al ADN (Green y Reed, 1998). Estos estímulos provocan un aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial (pérdida del potencial de la membrana mitocondrial), liberando moléculas pro-apoptóticas al citoplasma, tales como el citocromo *c*. Una vez liberado, produce la activación de la caspasa 9, la cual cliva y activa proteasas ejecutoras (Shi, 2002).
Ambas vías, la extrínseca y la intrínseca, convergen en la activación de las caspasas ejecutoras, y posteriormente en otras nucleasas que impulsan los eventos terminales de la muerte celular programada.

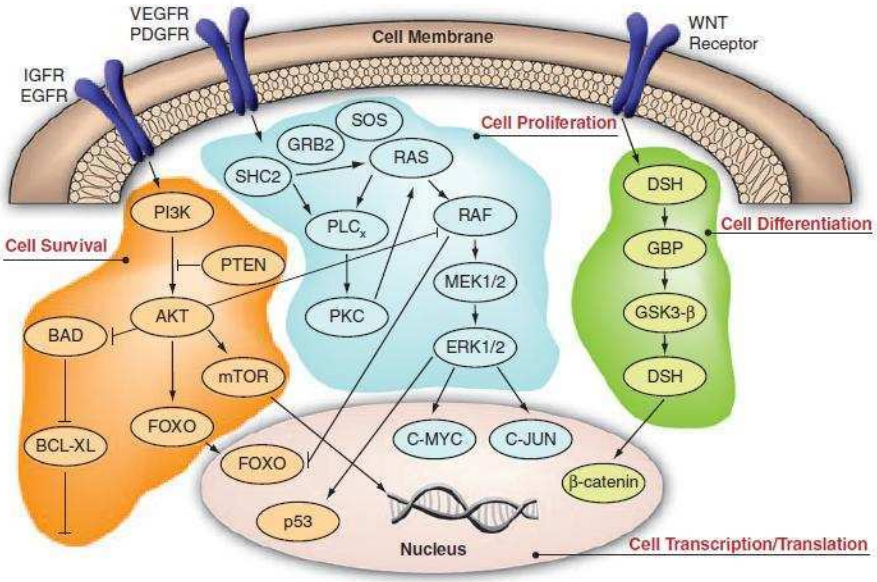
Entre las caspasas, la caspasa 3 es la más abundante en las células y es la responsable de la mayoría de los efectos apoptóticos. Se expresa en forma ubicua en los tejidos humanos normales incluyendo el hígado, y su sobre-expresión y la pérdida de expresión han sido reportadas en varias líneas celulares y diversos tumores malignos; respectivamente (Nakagawara et al., 1997; Yu y Little, 1998; Izban et al., 1999; Kolenko et al., 1999; Winter et al., 2001; Devarajan et al., 2002).

Por otra parte, las proteínas de la familia Bcl-2 controlan el potencial de membrana mitocondrial. Los miembros de esta familia pueden ser pro- (Bax, Bak, Bid y Bam) o anti-apoptóticos (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1 y A1), y su expresión relativa es la que controla el destino de la célula. Frente a un estímulo apoptótico, Bax se transloca a la mitocondria (Wei et al., 2001) y una vez inserta en la membrana, se oligomeriza para formar poros y liberar moléculas pro-apoptóticas de la mitocondria. Se ha demostrado que esta proteína se encuentra desregulada en el HCC con disfunción de la vía de p53 (Beerheide et al., 2000).

I.3.2. Vías de señalización involucradas en la supervivencia/proliferación

Existen unas proteínas inhibidoras de la apoptosis conocidas como IAPs (IAP, *Inhibitor of Apoptosis Proteins*) que pueden prevenir la activación de la muerte celular mediante la inhibición de las caspasas ejecutoras, como las caspasas 3 y 7 (Suzuki et al., 2001) y la caspasa iniciadora 9. Se ha demostrado que tanto c-IAP1 como c-IAP2 inhiben la apoptosis inducida por varios estímulos cuando se sobre-expresan en células de mamífero. A su vez participan en la regulación del ciclo celular y en la modulación de la transducción de señales mediada por receptores (de Almagro y Vucic, 2012). En particular, regulan la vía extrínseca de la apoptosis a través de su actividad de ubiquitina ligasa promoviendo la ubiquitinación de varias moléculas, incluyendo TRAF2, TRAF3 y Smac de la vía de NF-κB, las cuales tienen implicancias directas sobre la supervivencia celular (Vucic et al., 2011). Esta actividad ligasa es crítica también para la activación de la vía de las MAPKs (Varfolomeev et al., 2012).

En estudios recientes, Colak y col., demostraron que el desarrollo del HCC está asociado con alteraciones en varias vías, incluyendo p53, MAPK, PI3K/Akt y TGF-β (Colak et al., 2010) entre otras (Figura 5).



(Whittaker et al., 2010)

Figura 5: vías de señalización implicadas en la patogénesis del HCC.

La vía de las MAPKs (también conocida como la vía RAF/MEK/ERK), es una vía de transducción de señales ubicua, que regula varios procesos celulares tales como la proliferación, la diferenciación, la angiogénesis y la supervivencia celular (Gollob et al., 2006). La sobre-expresión o activación de los componentes de esta vía contribuiría de alguna manera a la tumorigénesis, la progresión tumoral y la metástasis en una variedad de tumores sólidos (Leicht et al., 2007). En particular, la sobre-expresión de Ras se observa con frecuencia en el HCC (Calvisi et al., 2006) debido en parte al silenciamiento de inhibidores de esta vía (Calvisi et al., 2007). A su vez, se ha observado un aumento en la fosforilación de MEK1/2 (Huynh et al., 2003) y un aumento en la expresión y actividad de otros intermediarios como ERK (Feng et al., 2001).

En el HCC también se encuentra activada la vía PI3K/Akt/mTOR. La unión de factores de crecimiento (IGF y EGF) a sus respectivos receptores, activa PI3K y por consiguiente a Akt. De esta manera, Akt fosforila proteínas citoplasmáticas como mTOR y Bad. La activación de mTOR conduce a un aumento de la proliferación celular, mientras que la inactivación de Bad disminuye la apoptosis y aumenta la supervivencia celular (Roberts y Gores, 2005). Esta vía también puede activarse por anormalidades en PTEN, ya que este gen se encuentra ausente o con niveles muy bajos de expresión en casi la mitad de los HCCs (Hu et al., 2003).

La expresión de IGF-R y de EGF-R se encuentra aumentada en el HCC y en hígados cirróticos (Alexia et al., 2004), lo cual resulta en la estimulación de la vía PI3K/Akt/mTOR, como así también de las vías de las MAPKs y Wnt/β-Catenina (Desbois-Mouthon et al., 2001; Alexia et al., 2004).

Esta última vía, parece ser un evento importante en el desarrollo del HCC, a través de la desregulación de β-Catenina, que actúa como co-activador para estimular la transcripción de genes involucrados en la proliferación celular (como c-Myc y c-Jun, entre otros), la angiogénesis y la anti-apoptosis (Ávila et al., 2006).

Entre otras de las alteraciones más frecuentemente observadas en el HCC, se encuentran la inactivación de p53, la sobre-expresión de c-Myc y la activación de la telomerasa (h-TERT).

P53 es uno de los genes supresores tumorales más estudiados en la carcinogénesis. Numerosos estudios han demostrado que este gen supresor se encuentra mutado o

desregulado en la mayoría de los HCCs (Farazi y DePinho, 2006; Fabregat, 2009); a su vez -en aproximadamente la mitad de todos los tumores humanos- se inactiva por una única mutación puntual (Giaccia y Kastan, 1998). Este gen limita la supervivencia y la proliferación celular en respuesta al acortamiento de los telómeros, induce el arresto del ciclo celular en respuesta a la activación de oncogenes y protege la integridad del genoma frente a daño en el ADN (Merle y Trepo, 2009). Sin embargo, existen proteínas que son capaces de bloquear la actividad de este gen supresor, como es el caso de Ganquirina, que regula la fosforilación y la degradación de la proteína de retinoblastoma (pRb) (Higashitsuji et al., 2000), y aumenta la capacidad de la ubiquitina ligasa de MDM2 para reclutar a p53 en el proteosoma para su degradación (Higashitsuji et al., 2005). Esta oncoproteína se sobre-expresa tempranamente en la hepatocarcinogénesis (Fu et al., 2002).

Se ha demostrado que la expresión del oncogen c-Myc es reprimida por p53. Ésta se une al promotor de c-Myc produciendo una disminución en la acetilación de la histona H4 que se une a dicho promotor (Ho et al., 2005). Este proto-oncogen puede ser activado prácticamente por todas las vías de señalización mencionadas anteriormente. Además, estimula la expresión de muchos genes relacionados con el crecimiento; en particular, es capaz de activar la expresión y actividad de h-TERT (Cong et al., 2002). De esta manera, c-Myc actuaría como un regulador central en la transformación e inmortalización celular.

En este contexto, se cree que h-TERT juega un rol importante en la progresión del HCC. Su actividad está aumentada en más del 80% de biopsias humanas con este tipo de cáncer, mientras que en el tejido hepático normal su actividad es muy baja o casi indetectable (Satyanarayana et al., 2004). Además h-TERT también está implicada en la aparición de resistencia a múltiples drogas (MDR) en células tumorales. Los altos niveles de actividad de esta enzima y la elongación de los telómeros ayudan a mantener o aumentar la MDR (Kuranaga et al., 2001).

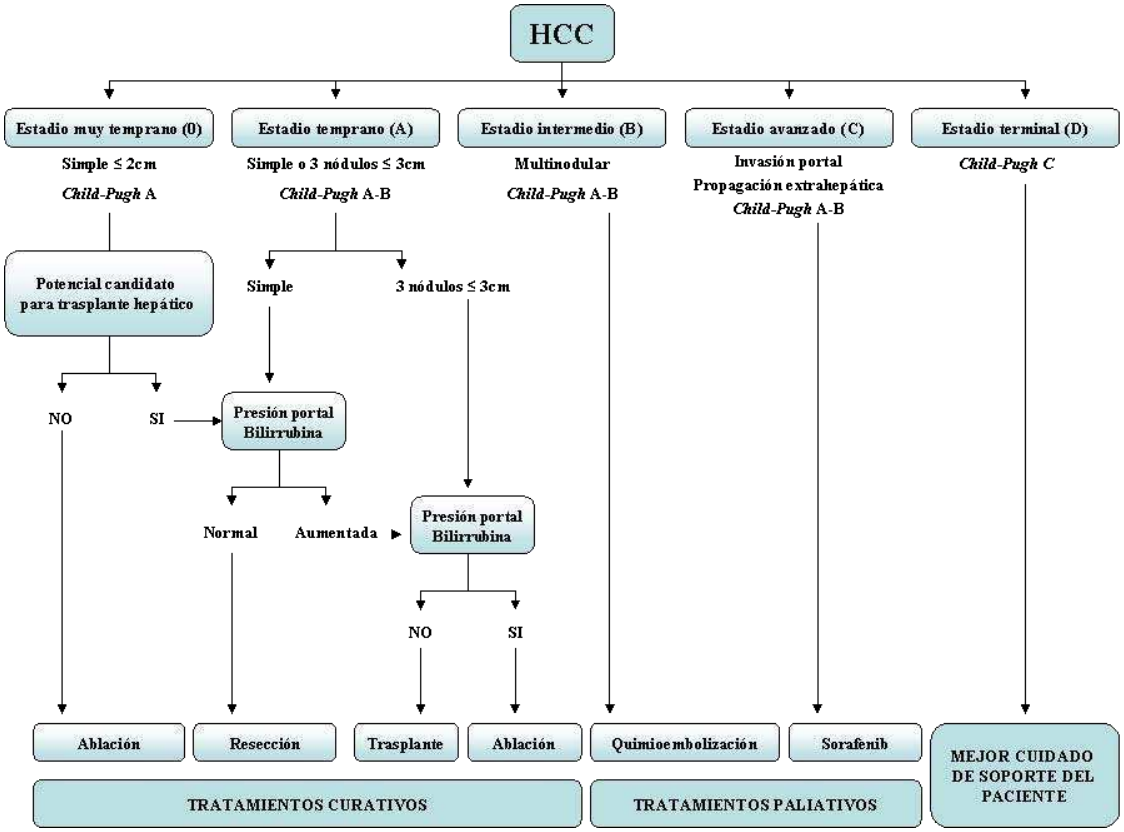
La tanquirasa es una polimerasa de poli (ADP ribosa) que facilita el acceso de la telomerasa a los telómeros. Se une a la proteína telomérica TRF-1 (factor de unión a las repeticiones teloméricas tipo 1), un regulador negativo del mantenimiento de la longitud de los telómeros y de esta manera modula la inhibición de la telomerasa en células tumorales humanas (Seimiya, 2006). Una vez que TRF es liberado, se produce su ubiquitinación y posterior degradación proteosomal (Chang et al., 2003). Consistente

con esto, el alargamiento de los telómeros es inducido por la sobre-expresión de tanquirasa exógena en el núcleo de células con actividad de telomerasa (Smith y de Lange, 2000). Esto conduce a la suposición de que la acción de la telomerasa en los telómeros puede ser regulada por inhibidores de la telomerasa y también por moléculas que regulan tanquirasa, el tratamiento continuo de células tumorales con estos inhibidores produce el acortamiento de los telómeros y, finalmente induce senescencia y/o apoptosis (Seimiya et al., 2002). De acuerdo a esto, los posibles inhibidores de la telomerasa tienen el potencial de beneficiar a los pacientes con cáncer.

Por ello es que resulta importante elucidar los mecanismos moleculares implicados en el HCC para lograr entender cómo se desarrollan estos tumores lo que permitiría desarrollar nuevas terapias moleculares dirigidas o mejorar las terapias ya existentes.

I.4. Terapéutica del HCC

Varios sistemas de estadificación han surgido en estos últimos años con el objetivo clasificar a los pacientes según el pronóstico y también para seleccionar el tratamiento adecuado. El sistema más utilizado en la actualidad es el BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer); el cual incluye el score Child-Pugh (evalúa el pronóstico de una enfermedad hepática crónica basándose en 5 criterios clínicos: nivel de bilirrubina total, albúmina sérica, tiempo de protrombina y presencia de ascitis y encefalopatía hepática), el estado clínico y estadio tumoral (tumor aislado, invasión multinodular, vascular o diseminación extrahepática) y clasifica a los pacientes en HCC precoz, temprano, intermedio, avanzado o terminal (Figura 6).



(Forner et al., 2012)

Figura 6: sistema BCLC y estrategias de tratamiento del HCC actualizadas en el año 2011.

Desafortunadamente, debido a la naturaleza asintomática del HCC temprano, en la mayoría de los pacientes esta enfermedad se diagnostica en etapas avanzadas cuando las terapias potencialmente más efectivas como la resección hepática, el transplante ortotópico y la ablación local muestran una baja eficacia. Además, en el 60-80% de los pacientes con cáncer de hígado, el tratamiento se complica por la presencia de una cirrosis subyacente y disfunción hepática (Thomas y Abbruzzese, 2005). En estas etapas avanzadas se utilizan comúnmente los tratamientos sistémicos; sin embargo, éstos también resultan mínimamente eficaces, tienen graves efectos secundarios y lo más importante es que la sobrevida del paciente no supera los 6-8 meses. A su vez, el HCC es poco sensible a la radioterapia, dejando a esta enfermedad sin opciones terapéuticas eficaces y con un muy mal pronóstico (Ávila et al., 2006).

Podemos dividir/clasificar a los tratamientos en quirúrgicos, loco-regionales y sistémicos.

Actualmente, los **tratamientos quirúrgicos** como la resección o el transplante ortotópico hepático son considerados como la única posibilidad de curación a largo plazo en pacientes con HCC. La resección hepática es un tratamiento adecuado para pacientes con HCC no asociados a cirrosis o en pacientes con una función hepática bien compensada. Esto significa que la resección quirúrgica es una opción de tratamiento para sólo una pequeña proporción de pacientes -menor al 18%- ya que casi el 85-90% de los pacientes con HCC presentan enfermedad hepática subyacente o cirrosis (Hung, 2005). Esto ha alentado a los investigadores a buscar otras modalidades de tratamiento que pueda superar el inconveniente del trasplante o la resección quirúrgica (Salhab y Canelo, 2011).

Las **terapias loco-regionales** tales como la ablación por radiofrecuencia, la ablación percutánea de etanol y la embolización y quimioembolización transarterial, se utilizan ampliamente como alternativas terapéuticas no quirúrgicas en pacientes con un HCC temprano y que no pueden recibir tratamiento quirúrgico, ya sea por la presencia de comorbilidades o por una función hepática insuficiente (Rossi et al., 2010). La mayor limitación de estos tratamientos radica en un pronóstico de vida pobre y en una recurrencia anual de entre un 15-25%, alcanzando el 80-90% a los 5 años post-tratamiento (Bruix y Sherman, 2005; Kudo, 2011). La **embolización** es el único tratamiento loco-regional que ha demostrado beneficios en estudios aleatorios en pacientes con HCC multi-nodular (Llovet et al., 2008; Bruix y Sherman, 2011). Se basa en la obstrucción de la vasculatura del tumor aumentando la concentración local del agente quimioterapéutico y produciendo una gran necrosis tumoral (Bruix et al., 1998). Cuando este procedimiento se realiza en combinación con agentes quimioterapéuticos (Ej. la doxorrubicina y el cisplatino), se denomina **quimioembolización**. La adición de estos agentes tiene como objetivo mejorar la acción antitumoral de la isquemia. En general, los agentes antineoplásicos se mezclan con lipiodol, el cual permite retener el fármaco dentro del tumor y a su vez disminuye el riesgo de los efectos secundarios asociados a la quimioterapia. El procedimiento se debe hacer de la manera más selectiva posible para afectar sólo al tumor y evitar al máximo el daño al tejido hepático subyacente. Este tratamiento logra respuestas efectivas en un 16-55% de los pacientes y es seguido de una reducción en la tasa de progresión y una mejoría en la sobrevida (Llovet et al., 2002; Lo et al., 2002; Llovet y Bruix, 2003).

Desafortunadamente, el HCC es un tumor relativamente resistente a la quimioterapia y, a pesar de los grandes esfuerzos de muchos investigadores, este tratamiento ha resultado bastante ineficaz, tal como se evidencia por los bajos índices de respuesta y ningún beneficio demostrado de supervivencia. Esta resistencia a la quimioterapia es causada principalmente por la sobre-expresión de proteínas resistentes a múltiples drogas –conocidas como proteínas o transportadores ABC– en la superficie de las células tumorales, lo cual provoca la extrusión activa de los fármacos fuera de la célula (Huang y Liu, 1999; Arancia et al., 2001) impidiendo que se alcancen concentraciones intracelulares terapéuticas. A esto se suma la disfunción de la proteína p53, que conduce a la inhibición de la apoptosis, como así también hace que las células tumorales sean menos sensibles a la hipoxia (Dart et al., 2004; Giménez-Bonafé et al., 2009).

Los **tratamientos sistémicos** se aplican a pacientes con HCC avanzado que no son candidatos para la resección quirúrgica, el transplante hepático o la ablación de tumores localizados. Entre estos, la **terapia hormonal** constituye una opción importante en el tratamiento de muchos tumores sólidos sensibles a hormonas, incluyendo el cáncer de mama, próstata, útero, ovarios y riñón. La presencia de receptores de hormonas en el HCC ha llevado a muchos investigadores a estudiar el rol de las hormonas en esta enfermedad. Los receptores de estrógenos (RE) se expresan en forma variable en este tipo de cáncer (Claviere et al., 1998). En modelos pre-clínicos, los estrógenos están implicados en estimular la proliferación de los hepatocitos *in vitro* y pueden promover el crecimiento del tumor *in vivo* (Francavilla et al., 1989). Por lo tanto, la determinación de los RE podría ser útil antes del comienzo de ciertas terapias de bloqueo hormonal. El tamoxifeno es un compuesto anti-estrogénico que inhibe el crecimiento de células tumorales por antagonismo competitivo de los estrógenos en su sitio receptor, por lo que los niveles de expresión de estos receptores representan la mejor predicción del beneficio del tamoxifeno (Osborne y Schiff, 2005). Dado que el 15-39% de los HCCs expresan RE-α y en un 39% de tumores hepáticos se ha observado sobre-expresión de receptores de progesterona, se han realizado en la última década ensayos clínicos con tamoxifeno en pacientes con HCC (Di Maio et al., 2006). Sin embargo, la mayoría de estos estudios demostró una baja tasa de supervivencia. Otro tratamiento sistémico está basado en la **inmunoterapia**. El interferón α (IFN-α) es una citoquina inmunomoduladora ampliamente utilizada en el tratamiento de la hepatitis crónica y se ha demostrado en ensayos pre-clínicos que tiene actividad antitumoral en varios tipos de

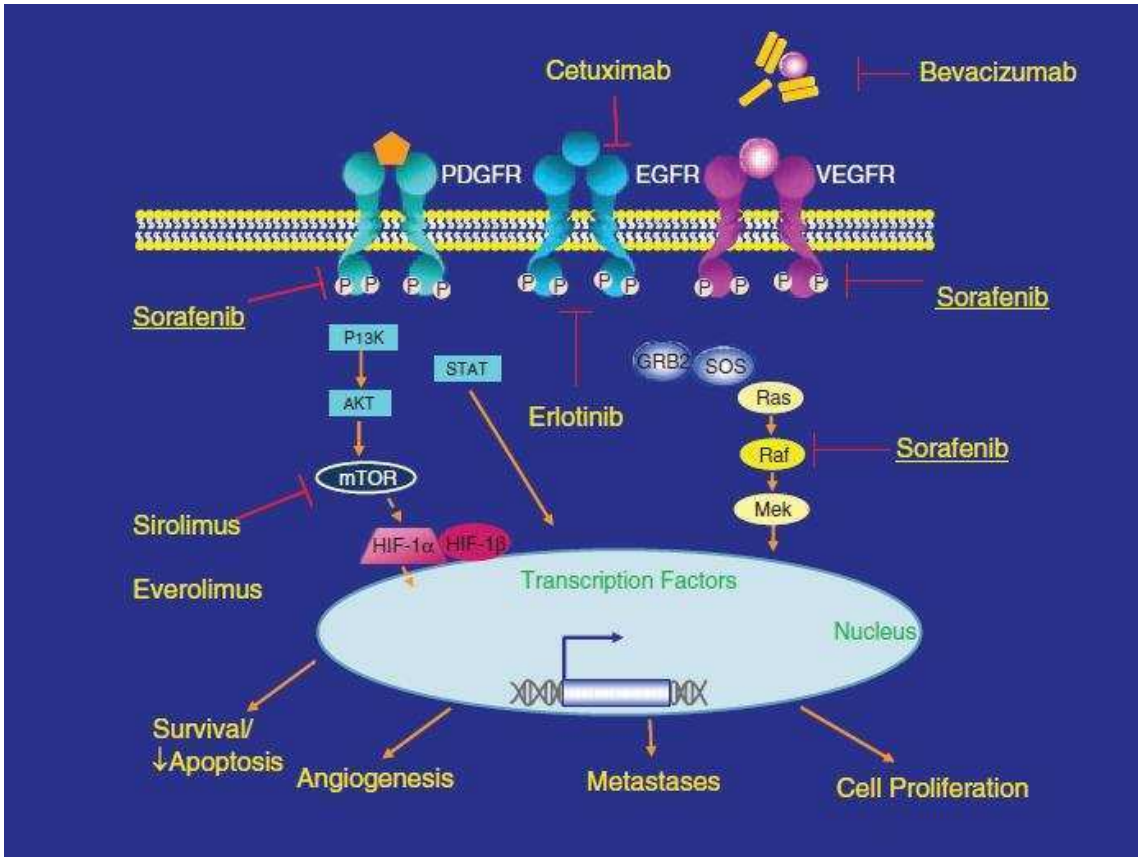
tumores, incluyendo el HCC (Ikeda et al., 1999; Wada et al., 2007). Además se ha propuesto que tiene propiedades anti-angiogénicas y anti-proliferativas (Lindner, 2002; von Marschall et al., 2003; Zhu et al., 2008). Por lo tanto, la terapia con IFN-α ha sido evaluada, aunque con resultados poco satisfactorios. Sin embargo, las combinaciones de IFN-α con quimioterapia parecen ser más eficientes. Actualmente se están desarrollando novedosas estrategias basadas en agentes inmunoterapéuticos, con resultados prometedores. Estos incluyen la administración de citoquinas y la administración de células dendríticas en combinación con linfocitos T activados con IL-12 y células NK (Ávila et al., 2006; Sun et al., 2006; Butterfield, 2007; Kayashima et al., 2010). La inmunoterapia antígeno-específica y la depleción de linfocitos Treg es otra estrategia prometedora en modelos pre-clínicos de HCC (Cany et al., 2011).

En la **quimioterapia sistémica estándar o convencional** los fármacos con mayor actividad contra el HCC son la doxorrubicina, el cisplatino y el 5-fluorouracilo (5-FU). La quimioterapia con cisplatino y 5-FU no ha resultado aún efectiva ya que presenta tasas de respuesta muy baja (<10%) sin un claro beneficio en la supervivencia global (Yeo et al., 2005). Si bien la doxorrubicina ha sido el medicamento contra el cáncer más eficaz utilizado para el tratamiento del HCC, la supervivencia es de tan sólo 4 meses con una tasa de respuesta de aproximadamente un 20% debido a la alta resistencia, además de presentar numerosos efectos adversos. Para mejorar la eficacia de este tratamiento se está ensayando la combinación de fármacos. Aunque muchos regímenes aún no han proporcionado evidencia de eficacia en pacientes con HCC, la combinación de doxorrubicina con paclitaxel ha demostrado efectos sinérgicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Jin et al., 2010). La poca eficacia de esta terapia es debida principalmente a la extrema resistencia de las células tumorales a la quimioterapia. **La sobre-expresión de varios miembros pertenecientes a la superfamilia de transportadores ABC es uno de los mecanismos que conducen al fenotipo MDR (*Multidrug Resistance*). Como se describirá más adelante, actualmente existen numerosos estudios a fin de lograr superar la MDR**.

En síntesis, en la actualidad no existe un tratamiento eficaz para los pacientes con HCC no resecable, dado que los resultados obtenidos con quimioterapia, hormonoterapia o inmunoterapia son poco alentadores y la sobrevida del paciente no mejora (Bruix y Sherman, 2011). El constante crecimiento en el área de las vías moleculares implicadas en la hepatocarcinogénesis está llevando poco a poco al desarrollo de múltiples

moléculas dirigidas a bloquear vías como RAF/MEK/ERK y PI3K/Akt/mTOR que son dos de las vías más involucradas en el desarrollo del HCC (Hanahan y Weinberg, 2011) como ya se mencionó anteriormente. Debido a una mejor comprensión de las bases moleculares de la hepatocarcinogénesis (por ejemplo, vías de señalización y alteraciones moleculares que promueven el crecimiento celular, entre otras), han surgido recientemente nuevas modalidades de tratamiento incluyendo la terapia molecular dirigida, la terapia génica y la terapia de genes antisentido (Park et al., 2011; Villanueva et al., 2011; Zheng et al., 2012).

En los últimos años el conocimiento acerca de los procesos biológicos de la hepatocarcinogénesis se ha expandido de manera significativa, permitiendo la identificación de los procesos moleculares implicados en esta enfermedad neoplásica. Entre estas moléculas se han identificado factores de crecimiento y angiogénicos con sus receptores, vías enzimáticas intracelulares en las que están implicadas las tirosinas quinasas y factores de transmisión de señales intracelulares. Todas estas moléculas representan posibles blancos moleculares para la terapia dirigida (Zhu, 2006). Dado que el HCC es uno de los tumores sólidos más vascularizados, VEGF parecería ser un mediador primario de la angiogénesis (Moon et al., 2003). Altos niveles de VEGF están correlacionados con un curso más agresivo de la enfermedad y una mala respuesta a la terapia (Poon et al., 2004). Por lo tanto, las vías de señalización de VEGF/VEGFR y PDGF/PDGFR son los principales blancos para el desarrollo de la terapia anti-angiogénica como terapéutica del HCC. La Administración Federal de Drogas (*Food and Drug Administration* (FDA), EEUU) aprobó los fármacos que afectan directamente a la vía de VEGF, incluyendo el anticuerpo anti-VEGF bevacizumab y los inhibidores de tirosinas quinasas multi-específicas sunitinib, sorafenib y pazopanib, los cuales inhiben VEGFR junto con otros receptores de tirosina quinasa (Figura 7) (Wiedmann y Mössner, 2011). Hasta la actualidad, el único agente que demostró ser eficaz en términos de la supervivencia de los pacientes es el **sorafenib**, que se convirtió en el fármaco estándar para el tratamiento paliativo del HCC (Llovet et. al., 2008; Siegel et al., 2008; Wiedmann y Mössner, 2011) (Figura 7).



(Zhu, 2008)

Figura 7: terapia molecular dirigida en el HCC. Vías implicadas y fármacos desarrollados para el tratamiento del HCC

Dicha droga actúa bloqueando la angiogénesis a través de la inhibición de VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, CD135, PDGFR-β y FGFR-1, los cuales dirigen la formación de nueva vasculatura (Matsuda et al., 2011). Este fármaco también actúa bloqueando la proliferación celular mediada por la vía de señalización de RAF/MAPK/ERK (Matsuda et al., 2011).

En un estudio doble ciego en fase II se observó que el sorafenib en combinación con doxorrubicina resultó en una mejora en el promedio de tiempo hasta la progresión de la enfermedad, la supervivencia global y la supervivencia libre de progresión comparado con la monoterapia con doxorrubicina (Abou-Alfa et al., 2010). Sin embargo, la terapia combinada sorafenib-doxorrubicina todavía no está indicada en el uso clínico de rutina.

Por último, las opciones terapéuticas para pacientes con HCCs avanzados tienen un impacto limitado y, por lo tanto, es de gran importancia el desarrollo de nuevos agentes y estrategias terapéuticas para este grupo de pacientes de modo de mejorar los resultados actuales.

II. VIRUS HEPATITIS B (HBV) Y HCC

II.1. HBV

Con más de 350 millones de portadores crónicos del HBV, el virus permanece como uno de los patógenos humanos más comunes que causa grandes problemas en la salud pública (Ganem y Prince, 2004; WHO, 2012). La infección por HBV es la décima causa de muerte en todo el mundo, lo que representa entre 520.000 y 1,2 millones de muertes cada año (WHO, 2012) y su prevalencia varía considerablemente en las diferentes regiones geográficas y según las diversas poblaciones (Custer et al., 2004; Ganem y Prince, 2004). La mayor prevalencia se encuentra en la región de Asia, África sub-sahariana y la cuenca del Amazonas, donde más del 8% de la población son portadores crónicos del virus de hepatitis B, y entre el 70-98% muestran evidencias serológicas de haber estado expuestos a este agente. Otros países como Japón, centro y este de Europa y Oriente Medio tienen prevalencias intermedias, con tasas de portadores crónicos del 1-8% y tasas de exposición del 10-60%. Las regiones restantes tienen bajas frecuencias de portadores crónicos (menos del 1%) y tasas de exposición del 0,5-2% (Kew, 2010). En las regiones con altas tasas de portadores de HBV, la infección casi siempre se adquiere en el momento del nacimiento o en los primeros meses de vida y en el 90% de los casos la infección sigue un curso crónico (McMahon et al., 1985; Hyams, 1995). Por el contrario, en el 90% de los casos de infección en la vida adulta esta presenta un curso agudo. La hepatitis crónica por este agente conlleva el riesgo de muerte por cirrosis y HCC (Shepard et al., 2006). Aproximadamente, entre el 70-80% de los HCC relacionados a HBV ocurre en hígados cirróticos, mientras que el resto se producen en ausencia de cirrosis subyacente (Bruix y Llovet, 2003). A pesar de la disponibilidad de una vacuna eficaz y segura contra la hepatitis B (Zanetti et al., 2008), la infección crónica por HBV sigue siendo, junto con el HCV el principal factor etiológico del HCC en todo el mundo (Parkin, 2006).

II.1.1. Características del virus

El HBV humano pertenece a la familia *Hepadnaviridae*. El genoma de los hepadnavirus está constituido por ADN circular laxo, parcialmente de doble cadena que se replica, a diferencia de otros virus con genoma a ADN, a través de una transcriptasa inversa (Summers y Mason, 1982) (Figura 8).

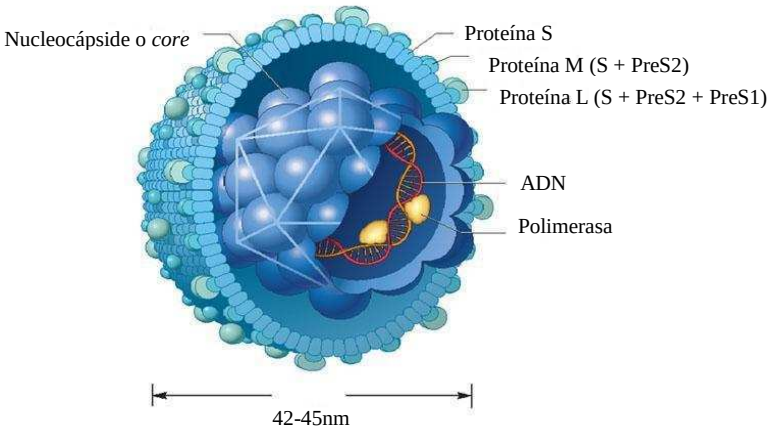


Figura 8: estructura general del HBV (Partícula de *Dane*).

Estas partículas virales, también conocidas como partículas de *Dane*, tienen un diámetro de 42-45 nm y constituyen el virión intacto. Presentan una nucleocápside o *core* que contiene el ADN viral junto con la polimerasa con actividad de transcriptasa inversa y ADN polimerasa y una envoltura externa formada por una bicapa lipídica y las proteínas de envoltura pre-S1, pre-S2 y S (o también conocida como HBsAg) que se encargan de la unión del virus y su entrada en las células del hospedador. Además existen las partículas esféricas y las filamentosas que son formas sub-virales no infectivas, dado que carecen de *core* y ADN viral (Thomas et al., 2005) (Figura 9).

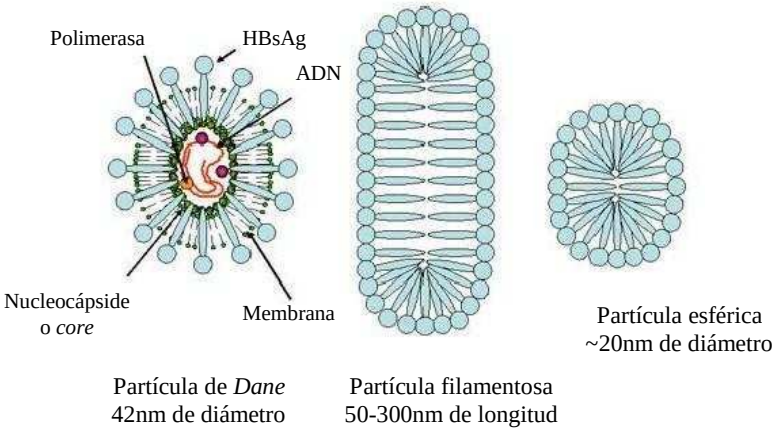
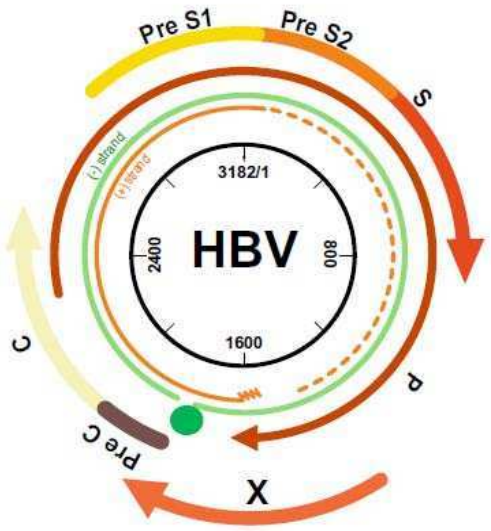


Figura 9: esquema de las partículas de *Dane*, partículas filamentosas y partículas esféricas del HBV.

El genoma del HBV es de alrededor de 3,2 Kb de longitud y presenta una organización genética muy compacta con 4 marcos abiertos de lectura (ORF, *open reading frames*)

que cubren el genoma completo. El ORF pre-S/S codifica las tres proteínas virales de envoltura, el pre-C/C codifica el antígeno e (HBeAg) y el antígeno del *core* (HBcAg), el P codifica la polimerasa viral que posee actividad de ADN polimerasa, transcriptasa inversa y ARNasaH, y el ORF X que codifica a la proteína homónima (Figura 10).



(Neuveut et al., 2010)

Figura 10: esquema del genoma circular y parcialmente doble cadena del HBV. Se muestran los ORF pre-S/S, pre-C/C, P y X.

II.2. Mecanismos moleculares que promueven el HCC por parte del HBV

El HBV produce infección crónica en 2-10% de los adultos y en aproximadamente el 90% de los niños. Un 10% de estos pacientes crónicos desarrollan daño hepático progresivo, incluyendo cirrosis y HCC. El mecanismo por el cual el HBV progresa a estas patologías no está muy claro aún; sin embargo, varios factores han sido implicados en la hepatocarcinogénesis, incluyendo el gen *HBx* y el gen *pre-S2* truncado. Además, el HBV puede integrarse en el genoma de la célula hospedadora, lo que conduce a cambios en la función genómica o la inestabilidad cromosómica (Fung et al., 2009).

Dado que en el presente trabajo de tesis doctoral ahondamos en el estudio de los mecanismos moleculares por los cuales la proteína X del HBV llevaría al desarrollo del HCC, nos centramos en el rol de dicha proteína en la hepatocarcinogénesis.

II.2.1. Proteína X del HBV (HBx)

HBx es una pequeña proteína multifuncional de 154 aminoácidos con actividad reguladora que modula la transcripción de genes virales y celulares, afectando de forma directa o indirecta la replicación y proliferación del virus (Shih et al., 2000; Bouchard y Schneider, 2004).

Se han demostrado numerosas funciones de esta enzima con actividad de quinasa (Figura 11).

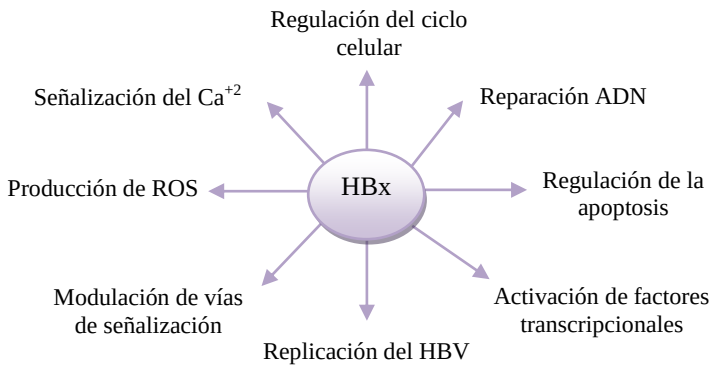
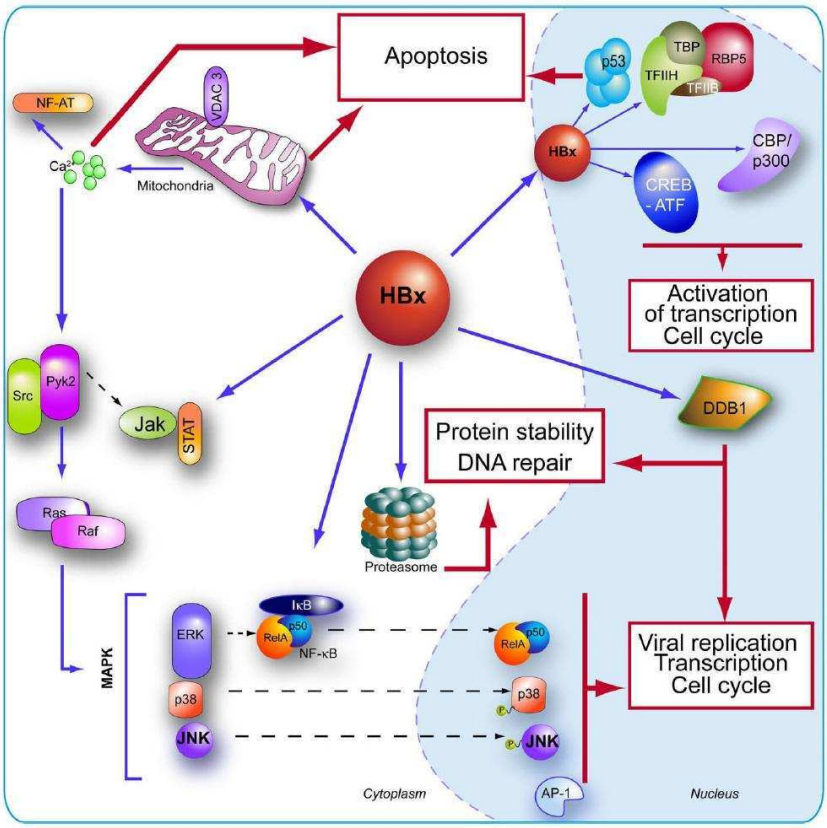


Figura 11: funciones generales de HBx. Esta proteína modula una serie de señales, muchas de las cuales están interrelacionadas.
ROS: especies reactivas de oxígeno

HBx regula positivamente no sólo a los promotores del HBV, sino también de otros virus como el HIV y de la propia célula hospedadora, a través de la interacción directa con factores transcripcionales como CBP/p300 y CREB/ATF. Los miembros de éste último grupo desempeñan un papel crucial en el metabolismo hepático y la proliferación, por lo que se ha implicado a CREB en la hepatocarcinogénesis (Abramovitch et al., 2004; Feitelson et al., 2009). También puede regular la transcripción de manera indirecta, actuando en vías de señalización como NF-κB y AP-1, resultando en la desregulación de los puntos de control del ciclo celular (Um et al., 2007) (Figura 12).



(Neuveut et al., 2010)

Figura 12: múltiples actividades biológicas de HBx.

Por otra parte, HBx juega un rol importante en la degradación de proteínas vía interacción con subunidades del proteosoma y en la apoptosis (Figura 13) a través de proteínas mitocondriales y caspasas (Gottlob et al., 2013; Han et al., 2000) e interactúa con la proteína supresora de tumores p53, lo que resulta en una pérdida de su función (Cheng et al., 2008).

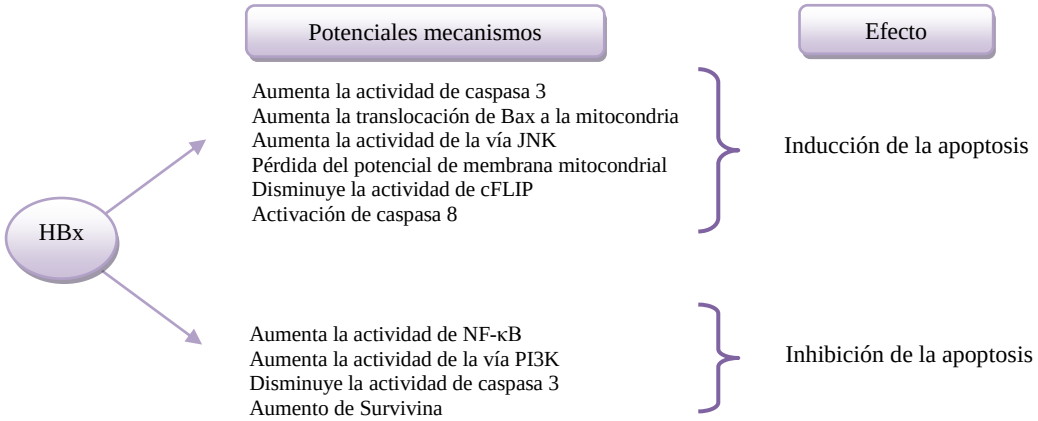


Figura 13: potenciales mecanismos por los cuales HBx induce o inhibe la apoptosis en diferentes células.

Además esta proteína transactiva genes que codifican para proteínas celulares de la familia de transportadores ABC como *mdr1* que codifica para la glicoproteína P (P-gp/MDR1), alterando la sensibilidad de las células a diferentes drogas (Lian et al., 2001; Han et al., 2007).

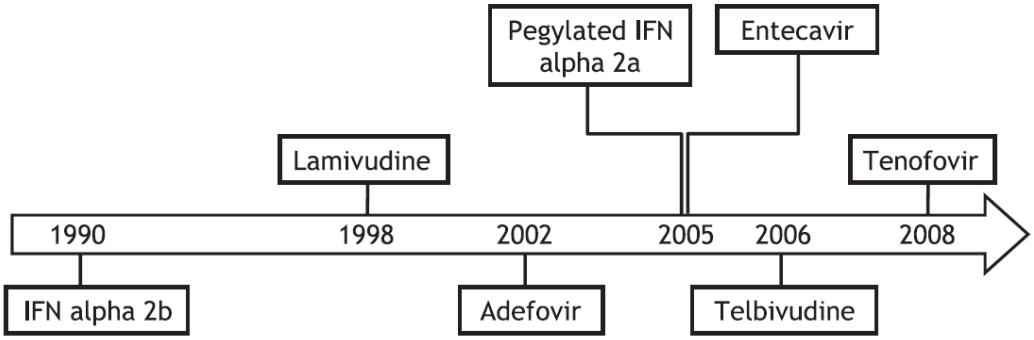
Estudios recientes han demostrado que HBx puede aumentar la expresión y actividad de h-TERT (Zhang et al., 2005) interfiriendo con su actividad durante la proliferación, favoreciendo de esta manera el proceso carcinogénico en los hepatocitos.

Se ha postulado que HBxAg podría estar involucrada en el desarrollo del HCC. Además, se observó que debido a su actividad transactivadora, podría producir alteraciones en la expresión de genes celulares que contribuirían a la transformación e inmortalización de los hepatocitos. Mutaciones en este gen han sido relacionadas con la progresión de la enfermedad hepática crónica debido a la disminución de los efectos anti-proliferativos y apoptóticos en los hepatocitos infectados, lo cual conduce a una proliferación descontrolada contribuyendo a la carcinogénesis (Yeh et al., 2000; Shinkai et al., 2007). Sin embargo, existen resultados controversiales acerca de las consecuencias de mutaciones en este gen y su relación con la patogénesis (Choi et al., 2009). Un cambio en las secuencias aminoacídicas en las posiciones 130 y 131 en HBx (M130K y V131I, respectivamente) producida por mutaciones puntuales T-A a nivel de los ácidos nucleicos han sido asociadas a daño hepático severo y HCC en pacientes de China y África (Hsia et al., 1996; Baptista et al., 1999). La mutación puntual que lleva a la sustitución I127T también tienen un alto impacto sobre las actividades biológicas de dicha proteína viral (Datta et al., 2008). Todos estos cambios han sido propuestos como marcadores pronóstico de daño hepático progresivo y HCC (Lindh et al., 1999). Contrariamente, Barbini y col., demostraron que mutaciones en las posiciones 127/130/131 asociadas a $HBeAg^{(-)}$, dan cierta protección de evolucionar a una patología hepática más severa, lo cual sugiere un efecto protector en la progresión de la enfermedad (Barbini et al., 2012).

II.3. Tratamiento anti-HBV

Las terapias antivirales actuales no son suficientes para erradicar la infección por HBV. El objetivo del tratamiento de la hepatitis B es reducir la progresión de la enfermedad y prevenir el desarrollo de cirrosis y HCC en pacientes con hepatitis B crónica a través de la supresión de la replicación viral (Khokhar y Afdhal, 2008) sin desarrollo de resistencia.

Si bien en esta última década se han desarrollo varios fármacos para el tratamiento de la hepatitis B crónica, en la actualidad aún no se dispone de una terapia eficaz contra el HBV (Figura 14). La decisión de utilizar una de estas drogas en particular depende de la categoría en la que se encuentre el paciente, así como también su condición clínica. Las principales consideraciones a tener en cuenta son la eficacia y seguridad, la resistencia, el costo y los efectos secundarios.



(Yuen y Lai., 2011)

Figura 14: terapias aprobadas para el tratamiento de la hepatitis B crónica a lo largo del tiempo.

Dentro de los tratamientos antivirales, se destacan el uso de Interferón alfa (IFN-α) y los análogos de nucleósidos.

Por muchos años la administración de **IFN-α** fue el pilar de la terapia contra la hepatitis B. Sin embargo, este tratamiento no es muy efectivo dada la gran cantidad de efectos adversos que presenta (Negro, 2010). El tratamiento con IFN-α se basa en una acción antiviral debido a la inducción y expresión de varios genes del hospedador y la activación funcional de una gran variedad de proteínas celulares (Rang et al., 2002) muchas de ellas involucradas directamente en la respuesta inmune contra el HBV, lo que resulta en la destrucción de los hepatocitos (Peters et al., 1986; Perrillo et al., 1990; Zoulim y Perrillo, 2008). Estudios a corto plazo han demostrado que la terapia basada en el IFN es modestamente eficaz en inducir la pérdida del HBeAg o seroconversión (30-40%) en pacientes HBeAg$^{(+)}$ (Lin et al., 1999; van Zonneveld et al., 2004) y en reducir sustancialmente la carga viral (20-30%) de pacientes HBeAg$^{(-)}$ (Lampertico et al., 2003; Papatheodoridis et al., 2005).

Con la aparición del IFN pegilado (PEG-IFN-α) se ha reemplazado la terapia convencional con IFN, dado que la adición del polietilenglicol (PEG) aumenta la vida

media del IFN en circulación, permitiendo ser administrado menos veces por semana; además de estar asociado con una mayor tasa de respuesta (Cooksley et al., 2003; Lau et al., 2005).

Luego de casi 10 años, la terapia contra la hepatitis B se vio revolucionada por el descubrimiento de los **análogos de nucleót(s)idos** que inhiben la actividad de la polimerasa viral, bloqueando la replicación del genoma del HBV. Todos los análogos de nucleót(s)idos actúan como inhibidores competitivos de la polimerasa viral, ya que compiten por la incorporación de los nucléot(s)idos naturales endógenos en el ADN viral. Una vez incorporado puede terminar la síntesis de ADN mediante la prevención en la incorporación del siguiente nucleót(s)ido en la cadena de ADN viral. El efecto de estos fármacos produce una disminución en la producción de partículas virales y, por lo tanto, limita la propagación del virus a los hepatocitos no infectados (Zoulim y Perrillo, 2008).

El primero de estos fármacos que tuvo gran éxito fue la **lamivudina**. Esta terapia oral provocó una rápida evolución en el tratamiento de la hepatitis B crónica ya que presentaba efectos adversos mínimos y además su uso no solo lograba la supresión del ADN del HBV sino que también se observó la normalización de los niveles de ALT y la seroconversión del HBeAg luego de un año de terapia (Lai et al., 1998). Sin embargo, la principal limitación en este tratamiento es el desarrollo de resistencia, la cual está mediada en gran parte por ciertas mutaciones puntuales en el centro catalítico de la transcriptasa inversa viral (Melegari et al., 1998).

El **adefovir** es un pro-fármaco que presenta una buena eficacia antiviral en pacientes $HBeAg^{(+)}$, con una reducción en la viremia de 3-4 log, aumenta la frecuencia en la seroconversión HBeAg y mejora la histología hepática (Marcellin et al., 2003). Una eficacia similar se documentó en pacientes $HBeAg^{(-)}$ con una función hepática anormal y niveles elevados de ADN viral (Hadziyannis et al., 2003). Además, este fármaco inhibe eficazmente la replicación de mutantes HBV resistentes a lamivudina, tanto *in vitro* como *in vivo* (Perrillo et al, 2000).

Por su parte el **entecavir** tiene una muy potente actividad inhibitoria de la replicación viral, donde más del 91% de los pacientes presentan niveles no cuantificables de HBV luego de 3 años de tratamiento (Yuen et al., 2011) y esta alta tasa continúa persistiendo luego de 5 años de tratamiento continuo (Chang et al., 2010). Este potente efecto antiviral está probablemente relacionado con su rápida fosforilación intracelular

(Langley et al., 2007). Otra característica importante es la muy baja probabilidad de aparición de resistencia (en pacientes *näive*, sólo el 1,2% luego de 5 años de tratamiento) (Tenney et al., 2009) lo cual está relacionado tanto con la supresión viral como con el requerimiento de al menos tres sitios de mutaciones genéticas con el fin de conferir resistencia. De acuerdo a esto, el entecavir es actualmente el agente de primera línea en el tratamiento de HBV en pacientes *näive* (Yuen y Lai, 2011).

La **telbivudina** es más potente que la lamivudina en la reducción del ADN viral luego de un año de tratamiento (Lai et al., 2007) y aunque comparten los mismos sitios de mutación asociados a resistencia y una única sustitución puede causar resistencia, la probabilidad de aparición de cepas resistentes a telbivudina es menor que en el tratamiento con lamivudina.

Finalmente, el **tenofovir-disoproxil fumarato** es un pro-fármaco del tenofovir con actividad contra la polimerasa viral del HBV que requiere ser bifosforilado para convertirse en el fármaco activo mediante esterasas séricas y tisulares. Exhibe una potente actividad antiviral (6 copias Log/ml) y baja probabilidad de resistencia (no se observó ningún caso luego de 4 años de tratamiento) (Snow-Lampart et al., 2009). También resulta muy eficaz para el tratamiento del HBV resistente a lamivudina. Por lo tanto, es uno de los agentes antivirales más utilizados en el tratamiento de pacientes con resistencia a lamivudina o telbivudina, como así también para pacientes sin tratamiento previo (*näive*). Un estudio demostró que el tenofovir es muy eficaz en poblaciones experimentales tratadas con esta droga, con un 79% de pacientes con niveles no cuantificables de ADN (< 80 UI/ml), luego de un período de 23 meses de exposición al fármaco (van Bömmel et al., 2010). De acuerdo a todas estas características, el tenofovir es recomendado como agente de primera línea para el tratamiento de pacientes *näive*.

Como se mencionó anteriormente, hasta el día de hoy no se dispone de un tratamiento eficaz para la hepatitis B crónica que logre erradicar totalmente al HBV del hospedador. Desde hace varias décadas se están investigando los mecanismos moleculares que favorecen la falla en la terapéutica anti-HBV al documentarse mutaciones en los sitios blanco de acción de los antivirales (ej. dominio de transcriptasa inversa [RT] de la polimerasa viral), pero sólo hace pocos años se está asociando dicha resistencia a la disfunción en la actividad de transportadores celulares. Modificaciones en la expresión y/o actividad funcional de dichas bombas transmembrana -denominadas Proteínas ABC (*ATP binding cassette transporters*)- producen una alteración en la sensibilidad a las

drogas en las células infectadas. En el primer caso la droga incorporada a la célula hospedadora no tendría efecto alguno sobre la cepa viral, en el segundo caso la actividad aumentada de ciertas bombas ABC no permitiría que se alcance la concentración de droga antiviral necesaria y suficiente dentro de la célula para que sea eficaz, generando el fenotipo MDR (*Multidrug Resistance*). Por ejemplo, MDR1 media el transporte de nucleót(s)idos inhibidores de la transcriptasa inversa (NRTIs), como el tenofovir y abacavir (van Gelder et al., 2002; Shaik et al., 2007). Además, se documentó que la exposición crónica a drogas antivirales puede inducir la expresión y actividad de MDR1 a través de interacciones con receptores nucleares como PXR (Dussault et al., 2001; Zastre et al., 2009). Algunos estudios demostraron que BCRP también es capaz de producir resistencia celular a varios análogos de nucleót(s)idos como zidovudina y lamivudina (Wang et al., 2003; Wang et al., 2004).

III. TRANSPORTADORES ABC

III.1. Generalidades

El transporte a través de la membrana lipídica de moléculas específicas es una función esencial de todos los seres vivos, y un gran número de transportadores específicos han evolucionado para llevar a cabo esta función.

Las proteínas ABC (*ATP-binding cassette*) forman una de las familias más grandes de moléculas de transporte activo (Higgins, 1992; Dean et al, 2001). Estos transportadores se encuentran en todos los organismos, desde procariotas a eucariotas (Davidson y Chen, 2004; Annilo et al., 2006) y sus funciones características abarcan desde el transporte de iones hasta macromoléculas (Dassa y Bouige, 2001; Szakács et al., 2006) usando la hidrólisis del ATP como fuente de energía.

Los genes *abc* son esenciales para algunos procesos celulares, y mutaciones en los mismos contribuyen a distintos desórdenes genéticos incluyendo fibrosis quística, enfermedades neurológicas, defectos en el transporte de colesterol y ácidos biliares, anemia y resistencia a drogas, entre otras.

Representan una superfamilia de 49 proteínas, dividida en 7 subfamilias (Tabla 2) las cuales están determinadas por su dominio de organización, es decir, por el número y la combinación de los dominios transmembrana (TMD) y los dominios de unión a ATP (NBD, dominios de unión a nucleótidos) (Stavrovskaya y Stromskaya, 2008; Liu, 2009).

Tabla 2: clasificación de los diferentes transportadores ABC humanos

Subfamilia	Nombre alternativo	Número de proteínas	Función principal	Ejemplos
ABCA	ABC1	12	Responsable del transporte de colesterol y lípidos	ABCA1, ABCA12
ABCB	MDR	11	Algunos se encuentran en la BHE, hígado y mitocondrias y transportan péptidos y bilis	ABCB1 (P-gp o MDR1) ABCB5
ABCC	MRP	13	Transporte de iones, secreción de toxinas	ABCC6
ABCD	ALD	4	Son todos usados en los peroxisomas	ABCD1
ABCE ABCF	OABP GCH20	1 3	Estos en realidad no son transportadores, sino simplemente dominios de unión al ATP derivados de la familia ABC. Regulan principalmente la síntesis o expresión de proteínas	ABCE ABCF1 ABCF2
ABCG	White	5	Transporte de lípidos, drogas, bilis, colesterol y otros esteroides	ABCG1 BCRP (ABCG2)

BHE: barrera hemato-encefálica

A pesar de observarse ciertas diferencias en sus funciones tales como la especificidad de sustrato, mecanismos moleculares y localización *in vivo*, todas comparten un alto grado de homología estructural y de secuencia (Higgins et al., 2007).

En los mamíferos, las proteínas ABC funcionalmente activas constan de 4 dominios característicos, dos TMD hidrofóbicos (TMD1 y TMD2) y dos NBD hidrofílicos (NBD1 y NBD2). Estos cuatro dominios pueden estar presentes en una cadena polipeptídica (transportadores completos o *full transporters*) o en dos proteínas separadas (transportadores medios o *half transporters*) (Figura 15A). En este último caso, los transportadores ABC se vuelven funcionalmente competentes luego de una dimerización específica (Altenberg 2003; Glavinas et al., 2004).

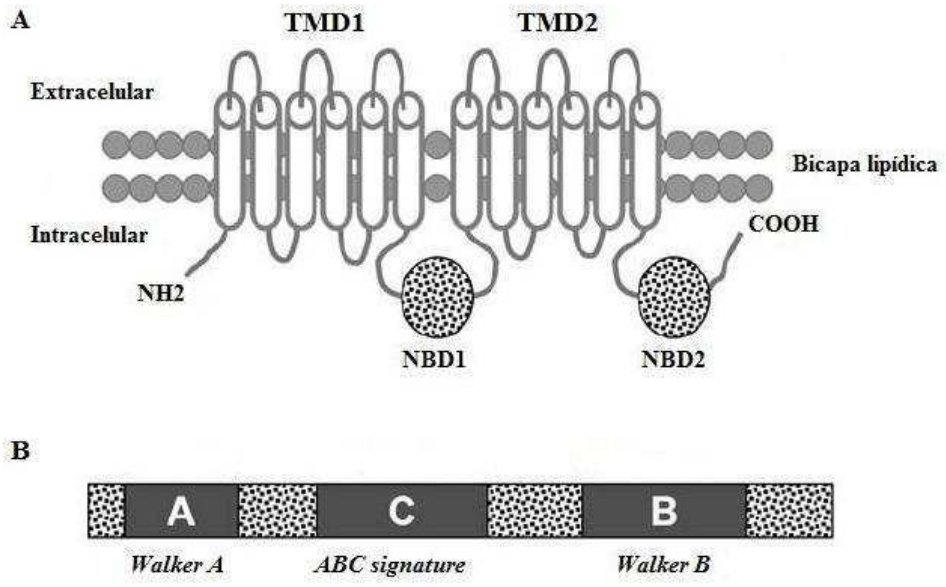


Figura 15: A) Diagrama de una proteína ABC típica embebida en la bicapa lipídica. La proteína contiene dos TMD y dos NBD. B) El NBD del transportador ABC contiene el *Walker A* y el *Walker B* que se encuentran en todas las ABC. Además se encuentra el motivo C (*ABC signature*).

Los dos TMD forman el sitio de unión al ligando y proveen especificidad de sustrato, mientras que los dos NBD unen e hidrolizan ATP para impulsar la translocación de dicho ligando. Los NBDs, pero no los TMDs, son homólogos en toda la familia de las ABC y tienen dos motivos característicos como el *Walker A* y el *Walker B;* y otros motivos, como el *ABC signature* que es único de la subfamilia MDR (Figura 15B). Algunas proteínas ABC contienen dominios adicionales o proteínas asociadas (TMD0), como la mayoría de los miembros de la subfamilia MRP (ABCC) que contiene un TMD0 cuya función aún se desconoce (Hipfner et al., 1999).

Las proteínas ABC juegan un papel relevante en el transporte tanto de endo- como de xenobióticos (Deeley et al., 2006). Cada ABC presenta un amplio espectro de sustratos que abarcan desde conjugados de glutatión (GST), glucurónidos y de sulfato (Leier et al., 1994; Kamisako et al., 1999; Qian et al., 2001), análogos de nucleótidos, sales biliares (Hirohashi et al., 2000), esteroides, prostaglandinas y fármacos tales como el cisplatino y las antraciclinas (doxorrubicina y daunorrubicina) (Deeley et al., 2006).
Además de la amplia especificidad de sustrato, cada vez existen más compuestos que se unen a los transportadores ABC, sin ser transportados, y muchos de ellos actúan como competidores.

En la actualidad hay un notable interés en el desarrollo de nuevos compuestos que puedan prevenir o revertir la resistencia a múltiples drogas (Boumendjel et al., 2005). **Como se mencionó anteriormente este fenotipo MDR se ha documentado tanto en la terapia antiviral como en la anticancerosa y es una causa muy importante de falla en la terapéutica del HBV y del HCC.**

III.2. Proteínas ABC involucradas en resistencia a múltiples drogas (MDR)

Se ha observado que varios transportadores ABC se encuentran sobre-expresados en diferentes tumores y líneas celulares de cáncer. En los seres humanos, los tres tipos principales de proteínas ABC involucrados en MDR incluyen miembros de las sub-familias ABCB (ej: P-gp/MDR1/ABCB1), ABCC (ej: MRP1/ABCC1) y ABCG (ej: BCRP/ABCG2) (Sarkadi et al., 2006).

III.2.1. MDR1 (*Multidrug Resistance 1*)

También conocida como P-gp o ABCB1 (Figura 16), fue el primer transportador ABC humano descubierto, clonado y caracterizado por su capacidad para conferir un fenotipo de resistencia a múltiples drogas en células tumorales (Juliano y Ling, 1976). Además, estos transportadores juegan un rol importante en la farmacocinética de numerosas drogas, afectando su biodisponibilidad.

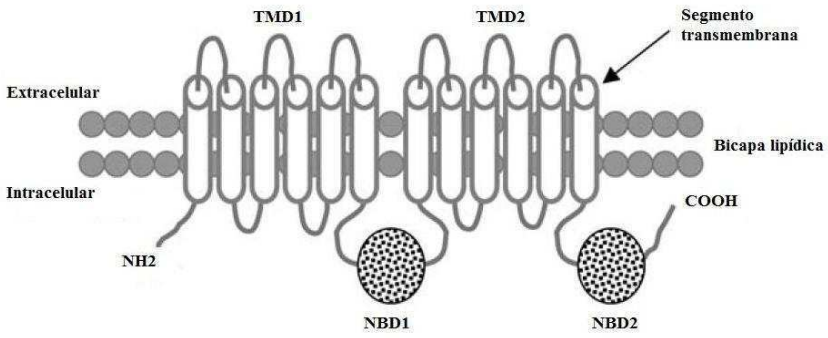
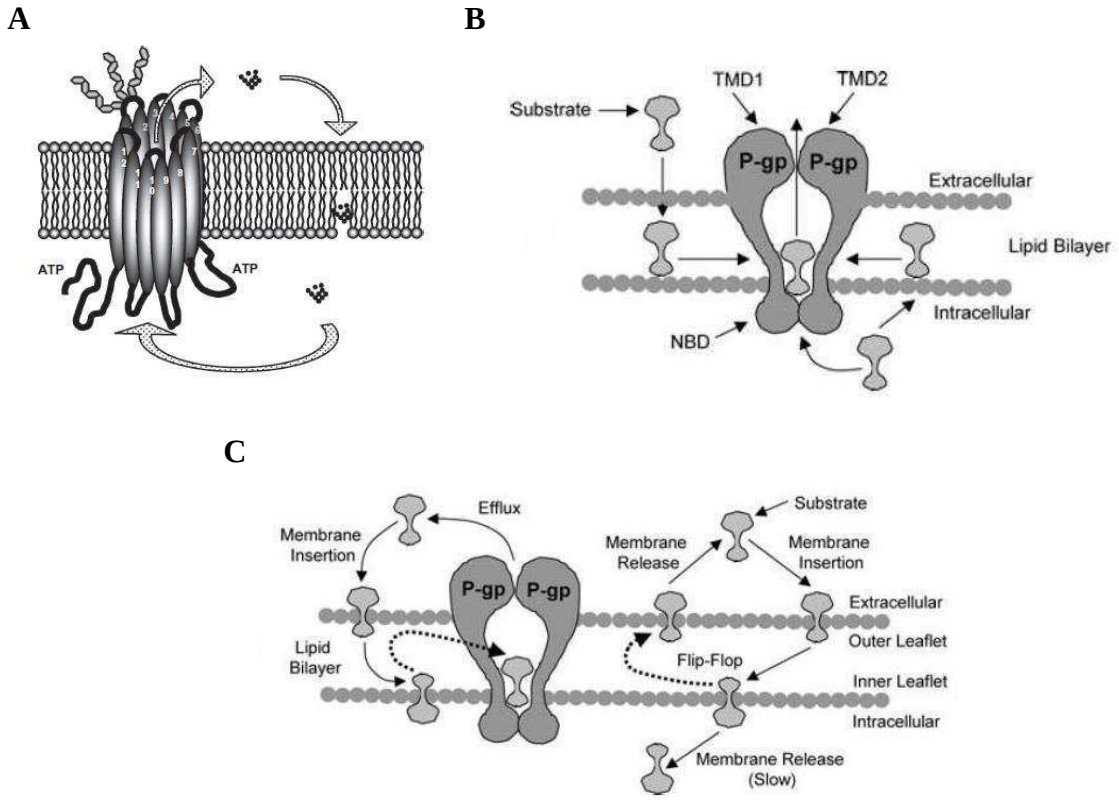


Figura 16: esquema de la proteína MDR1 (P-gp) embebida en la bicapa lipídica. La proteína contiene 2 TMD y 2 NBD.

Mediante el uso de la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP, MDR1 es capaz de bombear un amplio espectro de compuestos que incluyen los alcaloides de la vinca (vinblastina y vincristina), antraciclinas (doxorrubicina y daunorrubicina), taxanos (paclitaxel y docetaxel) (Szakacs et al., 2006) y otros agentes citostáticos. Sin embargo,

el mecanismo preciso de transporte para drogas y xenobióticos aún no se conoce con exactitud (Figura 17).



(Adaptado de Choudhuri y Klaassen, 2006)

Figura 17: mecanismos de acción propuestos para MDR1 (P-gp). A) Modelo clásico de bomba, según la cual MDR1 puede formar un poro transmembrana, a través del cual expulsa las drogas fuera de la célula mediante la energía de la hidrólisis del ATP. B) Modelo "*vacuum cleaner*". De acuerdo a este modelo los sustratos pueden ser transportados ya sea desde el lado intracelular o incluso desde dentro de la bicapa lipídica, por su reconocimiento como extraños a la membrana plasmática. C) El modelo "*flipasa*", el fármaco insertado en la cara interna de la bicapa lipídica puede ser transportado a la cara externa contra un gradiente de concentración desde el cual puede difundirse lentamente en el medio extracelular.

Se postula que MDR1 desempeña un rol importante en la eliminación de metabolitos tóxicos de las células. Por ello, es que se encuentra ampliamente distribuida en la mucosa intestinal, en la membrana luminal de las células del tracto gastrointestinal, en la membrana canalicular de los hepatocitos y en la barrera hemato-encefálica (BHE) (Ha et al., 2007). En menor proporción se expresa en placenta, corteza suprarrenal, testículos, útero, linfocitos y células hematopoyéticas (Fojo et al., 1987; Fromm, 2003; Thuerauf y Fromm, 2006). En dichos tejidos, tanto la localización de MDR1 como su estructura altamente conservada durante la evolución sugieren un papel importante para

esta proteína en la protección de las células de mamífero contra diversas toxinas y/o en el transporte de sustratos endógenos (Leslie et al., 2005).

MDR1 también se expresa en células tumorales que han desarrollado resistencia a diversos medicamentos (Gottesman et al., 2002). Esto se corresponde con la primer función conocida de esta proteína, descripta en 1976 por Juliano y Ling (Juliano y Ling, 1976). Tumores con bajos niveles de MDR1 (por ej., neoplasias hematológicas) a veces muestran un marcado aumento de expresión de este transportador luego de la quimioterapia (Petrini et al., 1995; Soto-Vega et al., 2008).

En HCC, se ha informado que la sobre-expresión de MDR1 está asociada a una supervivencia global más corta (Soini et al., 1996; Chou et al., 1997); curiosamente Ng y col. (Ng et al., 2000), documentaron esta asociación solo en pacientes previamente tratados con quimioterapia. Está descripto, que el alto nivel de expresión de MDR1 en los tumores se debe a la amplificación génica o a niveles elevados en la transcripción (Marthinet et al., 2000).

La sobre-expresión de este transportador planteó la posibilidad de que los oncogenes o genes supresores tumorales podrían regular la expresión constitutiva de MDR1. En ciertos tipos de tumores, las proteínas p63 y/o p73 juegan un rol complejo en la regulación de MDR1, que puede depender del entorno celular, el fármaco citotóxico utilizado durante el tratamiento, y mutaciones en p53 (Chin et al., 1992; Bush y Li, 2002; Johnson et al., 2005).

Se han descubierto numerosos inhibidores no específicos de MDR1 (verapamilo, tariquidar, disulfiram, entre otros), y a pesar de los resultados prometedores *in vitro*, usando varios modelos celulares de resistencia (Szakacs et al., 2006), el éxito de la modulación de la MDR a través del bloqueo químico del transporte del fármaco de las células tumorales sigue siendo difícil de lograr (Leslie et al., 2001; Szakacs et al., 2006).

III.2.2. MRP1 (*MDR Related Protein 1*)

Fue el primer miembro de la subfamilia ABCC descubierto en 1992 (Cole et al., 1992); su posterior caracterización permitió elucidar que esta proteína representa una bomba alternativa para el transporte de drogas.

El gen *mrp1* se encuentra localizado en el cromosoma 16p13.1 y codifica para una proteína de 1531 aminoácidos. Es una glicofosfoproteína integral de membrana (Figura 18) con un peso molecular aparente de 190 kDa (Flens et al., 1994; Almquist et al.,

1995) y funciona como un transportador activo primario utilizando la energía de la hidrólisis del ATP (Cole et al., 1994; Zaman et al., 1994).

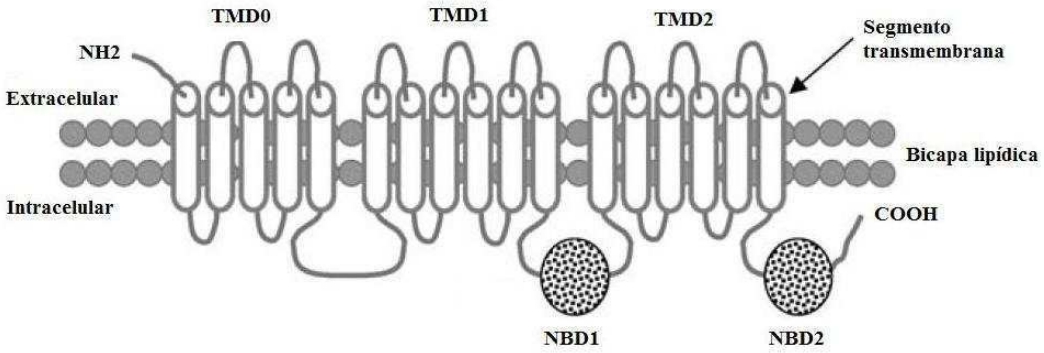


Figura 18: esquema de MRP1 en el que se detalla la estructura del transportador, con un TMD0 de 5 pasos transmembrana y los TMD1 y TMD2 con 6 pasos transmembrana cada uno, unidos entre sí por el NBD1. Además presenta un NBD2 en el extremo C-terminal.

Se cree que esta proteína juega un rol tanto en la protección de las células frente a la toxicidad química y el estrés oxidativo, como así también participando en la inflamación debido a su rol activo en el transporte de leucotrienos, tales como el leucotrieno C4 (LTC4) (Cole y Deeley, 1998).

A pesar de las diferencias estructurales, existe un considerable solapamiento con otros transportadores ABC en el espectro de fármacos a los que MRP1 confiere resistencia (como antihistamínicos, esteroides, antitumorales, inhibidores del HIV, entre otros). Sin embargo -a diferencia de MDR1- MRP1 necesita del glutatión celular para funcionar como bomba transportadora de fármacos (Leier et al., 1994; Cole y Deeley, 1998; Borst et al., 2000). Por ello es que los miembros de esta subfamilia de proteínas intervienen en el transporte de compuestos conjugados con glutatión (Stavrovskaya, 2000)

MRP1 se expresa en forma ubicua en el organismo. Los tejidos con mayor expresión de este transportador se localizan en pulmón, testículos, riñón, corazón y placenta, mientras que una expresión reducida de éste se ha detectado en el intestino delgado, colon, cerebro y células mononucleares de sangre periférica (Flens et al., 1996; Oselin et al., 2003). Además, MRP1 juega un papel muy importante en la disposición de drogas y xenobióticos en células normales y ayuda a proteger ciertos tejidos de injurias citotóxicas. En efecto, la distribución tisular de MRP1 es consistente con su rol de limitar la penetración de ciertos agentes citotóxicos a través de un gran número de barreras sangre-órgano. De esta manera, MRP1 contribuye a los llamados “sitios

santuarios" del organismo, tales como la BHE y la barrera hemato-testicular (Leslie et al., 2005).

En enfermedades hepáticas graves y el HCC, la expresión de MRP1 se encuentra aumentada y se asocia a un fenotipo tumoral más agresivo (Bonin et al., 2002; Vander et al., 2008). A pesar del aumento en los niveles de expresión de esta proteína en tumores malignos de hígado, algunos estudios informaron que no se han encontrado diferencias significativas en los niveles de expresión de MRP1 en tejido neoplásico y peri-neoplásico (Bonin et al., 2002). Nies y col. no evidenciaron ningún rol de MRP1 en el fenotipo MDR en HCC (Nies et al., 2001).

Fueron empleados varios inhibidores no específicos de MRP1, como el verapamilo, PSC-833, laniquidar y disulfiram, pero en todos los casos no superaron con éxito los ensayos clínicos, debido a que no mejoraron ni empeoraron la salud de los pacientes (Szakacs et al., 2006).

III.2.3. BCRP (*Breast Cancer Resistant Protein*)

BCRP (MXR/ABCG2) es una proteína de 72 kDa (Figura 19) compuesta por 665 aminoácidos, identificada por primera vez en 1998 en una línea celular MDR de cáncer de mama (MCF7/Adr-Vp) que no expresa MDR1 y MRP1 (Doyle et al., 1998). Sin embargo, en la actualidad no hay evidencias de que este transportador se exprese preferentemente en tejido de mama normal o neoplásico, y su relevancia clínica aún no está bien establecida.

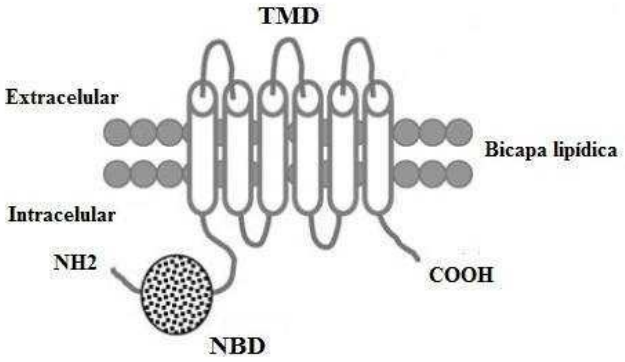
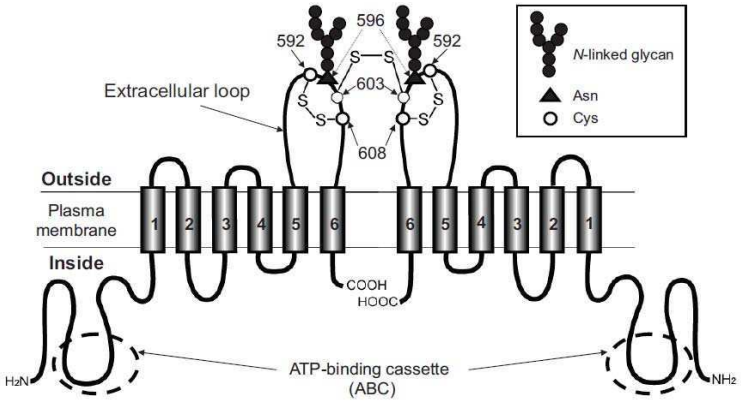


Figura 19: esquema de BCRP en el que se detalla la estructura del transportador medio, con un TMD de 6 pasos transmembrana y un NBD en el extremo N- terminal.

A diferencia de MDR1 y MRP1, BCRP es un transportador medio ya que contiene solo un dominio TMD y un NBD (Henriksen et al., 2001; Ozvegy et al., 2001).

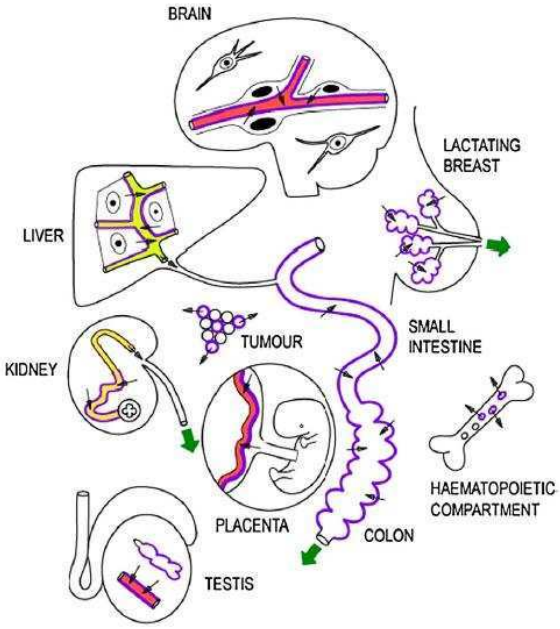
Recientemente, se ha demostrado que BCRP se encuentra en la membrana plasmática en forma de homodímero unido a través de los residuos de cisteínas unidas por puentes disulfuro (Wakabayashi et al., 2006; Wakabayashi et al., 2007) (Figura 20).



(Ishikawa y Nakagawa, 2009)

Figura 20: ilustración esquemática de la estructura de la proteína BCRP y la localización de los aminoácidos cisteína (Cys) y asparagina (Asn).

BCRP está presente en una gran variedad de tejidos (Figura 21), siendo más abundante en el hígado, epitelio intestinal, placenta y BHE (Liu 2009).



(Vlaming et al., 2009)

Figura 21: distribución tisular de BCRP. La presencia de este transportador se indica en violeta. Las flechas negras indican la dirección de transporte de sustratos por BCRP, mientras que las flechas verdes indican la excreción neta del cuerpo de los sustratos de BCRP.

Se expresa en la membrana apical de los hepatocitos, células epiteliales del intestino y del riñón donde bombea una gran variedad de compuestos endógenos y exógenos fuera de la célula. Debido a su actividad en estos órganos excretores, BCRP puede tener un importante efecto sobre la farmacocinética de muchos fármacos y sus metabolitos, aumentando su excreción y limitando su absorción desde el lumen intestinal a la circulación (Mottino et al., 2000; Maliepaard et al., 2001). Cisternino y col, demostraron que tanto la expresión del ARNm de *bcrp* como su proteína, aumentaban en ratones *knockout* para MDR1 versus ratones salvajes, sugiriendo un mecanismo de compensación por la falta de MDR1 (Cisternino et al., 2004).

BCRP se localiza también en la zona apical de las células epiteliales alveolares (Figura 21) de la glándula mamaria, principal sitio de producción de leche materna (Vlaming et al., 2009). Además, se ha documentado que la expresión de BCRP es fuertemente inducida durante el embarazo y la lactancia (Jonker et al., 2005) y tal vez esto justifique la hipótesis de que además de ser un transportador de xenobióticos, también puede estar involucrado en la transferencia de nutrientes de la madre al bebé, a través de la leche.

De acuerdo a su rol en la desintoxicación, BCRP se ha encontrado sobre-expresada en numerosas líneas celulares de cáncer y tumores humanos, especialmente adenocarcinomas del tracto digestivo, pulmón y endometrio (Diestra et al., 2002). En estudios retrospectivos, se encontró que la tasa de respuesta a la quimioterapia en los pacientes se correlacionaba con la expresión de BCRP (Yoh et al., 2004; Uggla et al., 2005).

En los HCCs, BCRP se encuentra aumentada y confiere resistencia a un rango estrecho de agentes antitumorales, comparado con MDR1 y MRP1. Sin embargo, el espectro incluye antraciclinas como la doxorrubicina y daunorrubicina, mitoxantrone y los inhibidores de la topoisomerasa I como la camptotecina. Por otro lado, BCRP no confiere resistencia a los alcaloides de la vinca, paclitaxel o cisplatino (Allen y Schinkel, 2002).

Además, existen evidencias de que BCRP es capaz de alterar la absorción, el metabolismo y la toxicidad de los inhibidores de tirosinas quinasas, como imatinib (STI-571) y gefitinib (ZD 1839) (Ozvegy-Laczka et al., 2005).

III.3. Estrategias para revertir el fenotipo MDR

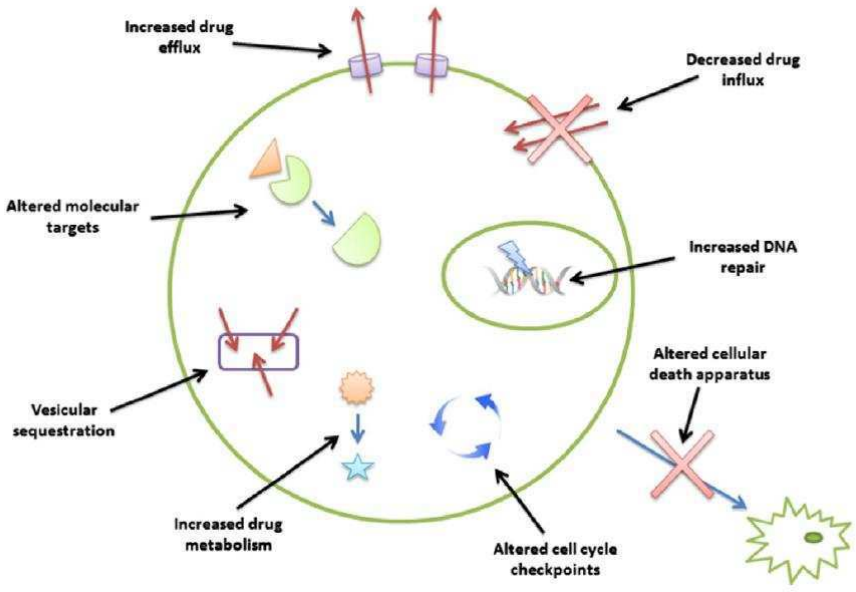
La quimioterapia es el tratamiento de elección para los pacientes diagnosticados en etapas avanzadas del cáncer y/o con metástasis. El principal desafío es entonces,

administrar una dosis de fármaco que optimice la eficacia y minimice la toxicidad del tratamiento. Desafortunadamente, en un número significativo de pacientes, el tumor no responde a los agentes terapéuticos. Este impedimento es el resultado de algunos mecanismos ya conocidos, y otros por conocer, de resistencia a la quimioterapia. Estos mecanismos pueden actuar de manera individual o sinérgica, en la cual la célula se vuelve resistente a una variedad de fármacos no relacionados estructural ni mecánicamente (Gillet y Gottesman, 2010).

En los últimos años, se ha realizado un gran esfuerzo para mejorar el tratamiento del cáncer mediante la identificación de nuevos blancos en las células tumorales, los cuales promueven la desregulación del crecimiento celular, invasión y metástasis (Luo et al., 2009). Independientemente de la estrategia empleada para el tratamiento, el desarrollo de MDR sigue siendo un impedimento.

La MDR es mediada por una serie de alteraciones moleculares y celulares. Éstas incluyen la disminución en la acumulación intracelular del fármaco, cambios en los niveles de expresión de proteínas "*target*", mutaciones que disminuyen la unión del fármaco a su sitio de acción, el secuestro del fármaco en vesículas acídicas, el metabolismo alterado de los fármacos, el aumento a la tolerancia al daño celular y la disminución de la señalización de la apoptosis (Gottesman et al., 2002; Gong et al., 2012) (Figura 22).

En este trabajo de tesis el término MDR hará referencia al primero de los mecanismos descriptos, como es la disminución en la acumulación intracelular del fármaco por aumento en la expresión y/o actividad de las bombas ABC.



(Gong et al., 2012)

Figura 22: mecanismos de MDR en células tumorales.

La reducción en la acumulación celular de fármacos se produce a través de la disminución de la expresión de los "importadores (*importers*)" pasivos de la superficie celular y del aumento en la expresión de los transportadores ABC.

El transportador ABC más conocido es P-gp. Se ha demostrado que su sobre-expresión en varios tipos de tumores malignos se correlaciona con una mala respuesta a la quimioterapia y un mal pronóstico (Szakacs et al., 2006). Existe una gran cantidad de bibliografía sobre el desarrollo de MDR *in vitro* e *in vivo* (Hoffman et al., 2011). La MDR se caracteriza por una amplia resistencia cruzada que P-gp confiere a los agentes citotóxicos estructuralmente disímiles, es decir, el desarrollo de resistencia por parte de una célula a una determinado fármaco produce resistencia a otros fármacos con mecanismo similar (Szakacs et al., 2006; Sheps y Ling, 2007). La capacidad que presenta P-gp para actuar como una bomba de múltiples drogas todavía no ha sido dilucidada a nivel molecular, pero este transportador proporciona un fuerte mecanismo de resistencia (Gottesman et al., 2002).

También se ha documentado que otros transportadores ABC aumentan su expresión en respuesta a la continua administración de drogas que favorece la selección de células de cultivo con fenotipo MDR, principalmente MRP1 y su homólogo MRP2 y BCRP (Borst et al., 2000; Dean et al., 2001; Sukowati et al., 2012).

Estos transportadores, al igual que P-gp/MDR1, bombean los fármacos antitumorales fuera de la célula, lo que resulta en una disminución de los niveles intracelulares del fármaco necesarios para la eficacia terapéutica.

La MDR es un obstáculo importante para el tratamiento eficaz del cáncer. Numerosas estrategias se han desarrollado a lo largo de los años para revertir este fenotipo, siendo las más estudiadas el descubrimiento y la implementación de inhibidores específicos de MDR1, MRP1 y BCRP (Fromm et al., 2003; Houghton et al., 2004; Breedveld et al., 2006; Mansilla et al., 2007) utilizados conjuntamente con drogas antitumorales. Estos agentes de reversión, conocidos como quimiosensibilizadores o moduladores de MDR, podrían revertir la resistencia.

La mayoría de los ensayos con agentes de reversión han tenido resultados decepcionantes (Fisher y Sikic, 1995; Fisher et al., 1996; Ferry et al., 1996; Bradshaw y Arceci, 1998; Leonard et al., 2003). Esto se debe a que cada ABC presenta un amplio espectro de sustratos con especificidades superpuestas; como consecuencia de ello, el rol de un transportador ABC inhibido puede ser suplantado por otro transportador alternativo, llevando a una difícil interpretación de los resultados en pacientes.

Los primeros agentes de reversión de MDR, como el verapamilo y la ciclosporina, resultaron de una baja especificidad y afinidad, y en algunos casos se encontraron efectos farmacocinéticos que condujeron a disminuir la dosis del agente quimioterapéutico, no sólo por la toxicidad intrínseca del fármaco sino también por una mayor concentración del antitumoral debida a la inhibición de los transportadores ABC (Krishna y Mayer, 2000; Thomas y Coley, 2003). Para solucionar este problema, se comenzaron a desarrollar análogos con una toxicidad menor (Toffoli et al., 1995; Teodori et al., 2002).

La segunda generación de agentes de reversión, como el valspodar, resultó ser 10-20 veces más potente, además de presentar menor toxicidad y ausencia de actividad inmunosupresora (Twentyman y Bleehen, 1991; te Boekhorst et al., 1992). Este compuesto actuaría como un inhibidor no competitivo mediante la unión a un sitio diferente del sitio de unión al sustrato, alterando así la conformación de MDR1 (Atadja et al., 1998; Jette et al., 1998). También se encontró que el valspodar interactúa directamente con MDR1 con alta afinidad y que probablemente interfiere con su actividad ATPasa (Atadja et al., 1998). De acuerdo a estos datos, este compuesto ha sido ampliamente estudiado en ensayos clínicos, incluyendo estudios de fase III. Sin embargo en estudios más recientes en leucemia linfocítica crónica y mieloide aguda, se

observaron casos de aumento de la toxicidad y muerte asociada al fármaco (Gruber et al., 2003).

Más recientemente, se han logrado desarrollar agentes de reversión de tercera generación, con alta afinidad y especificidad, entre ellos el zosuquidar (Fracasso et al., 2004; Gerrard et al., 2004; Sandler et al., 2004). Sin embargo, en la actualidad, los ensayos de fase II, no mostraron resultados prometedores (Ruff et al., 2009).

En los últimos años, se han propuesto nuevos enfoques alternativos para atacar las células tumorales y superar el fenómeno de resistencia mediada por estos transportadores ABC. Algunos de ellos comprenden el uso de anticuerpos monoclonales específicos contra cada transportador, análogos peptídicos, el uso de estrategias anti-sentido (Ej. oligonucleótidos anti-sentido, ribozimas y siRNA) que desregulan la expresión génica a nivel del mensajero o reguladores transcripcionales que inhiben la activación transcripcional de genes *abc* (Nobili et al., 2006; Lee, 2010).

Otra estrategia importante es el desarrollo de drogas antitumorales que no son sustratos de las bombas ABC, y por lo tanto, no son susceptibles de ser expulsadas de las células tumorales que sobre-expresan dichas bombas (Blagosklonny, 2003; Fojo y Menefee, 2005; Cortes y Baselga, 2007).

IV. POLOXAMINAS Y POLOXÁMEROS

Tanto la hepatitis crónica por HBV como el HCC constituyen enfermedades de alto impacto social y económico donde la farmacoterapia puede ser abordada y mejorada de manera notable utilizando diversas estrategias nanotecnológicas.

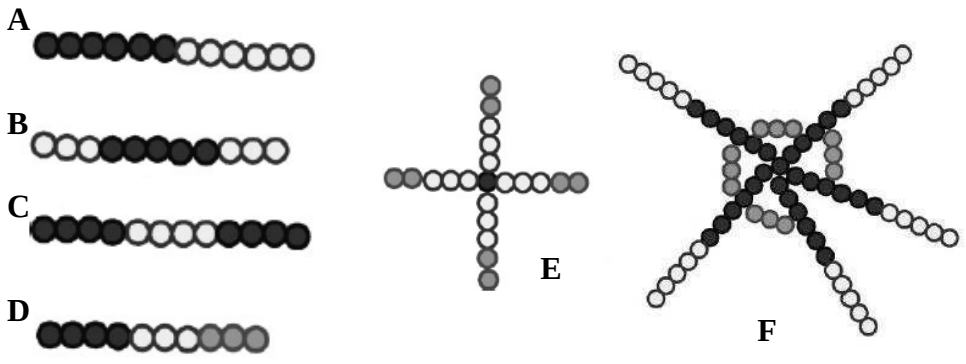
Una de las estrategias que se está evaluando en la actualidad para mejorar la eficacia de la terapéutica antiviral y antitumoral –además de disminuir los efectos adversos y mejorar la biodisponibilidad de los fármacos– es la formulación de fármacos donde el compuesto activo esté acompañado de co-polímeros segmentados de poli(óxido) de etileno (PEO) y poli(óxido) de propileno (PPO); ya sea en forma de unímeros o como micelas poliméricas.

IV.1. Características generales

Un co-polímero, por definición, es un polímero compuesto por diferentes monómeros unidos entre sí por varios tipos de enlaces químicos.

Diferentes tipos de co-polímeros, tanto de origen natural como sintético, han sido identificados, evaluados y utilizados a fin de aprovechar sus nuevas y novedosas propiedades físico-químicas, para su aplicación en diferentes campos.

Los co-polímeros más comúnmente utilizados en aplicaciones farmacéuticas son los co-polímeros de bloque, los estrellados y los reticulados (Figura 23).



(Hamidi et al., 2012)

Figura 23: esquema de los co-polímeros más comunes utilizados en aplicaciones biomédicas (monómero A; monómero B; monómero C).
A) Co-polímero de bloque AB; B) Co-polímero de tri-bloque BAB; C) Co-polímero de tri-bloque ABA; D) Co-polímero de tri-bloque ABC; E) Co-polímero estrellado y F) Co-polímero reticulado

Los co-polímeros son preparados no sólo a través de la polimerización de una variedad de combinaciones de monómeros con diferentes propiedades, sino también mediante la unión de bloques de diferentes longitudes de unidades estructurales repetidas, generando estructuras con propiedades diferentes y únicas (Letchford y Burt, 2007). La combinación de diferentes unidades químicas en estructuras co-poliméricas resulta en nuevos materiales con nuevas y variadas propiedades. Por lo tanto, los co-polímeros pueden ser utilizados en la preparación de diferentes nanoestructuras con una amplia variedad de características. La posibilidad de sintetizar un segmento hace que sea factible cambiar sus propiedades mediante el control del peso molecular y la adición o eliminación de grupos químicos funcionales, formando estructuras con las funciones específicas deseadas.

En particular, los poloxámeros y las poloxaminas, también conocidos comercialmente bajo el nombre de Pluronic® y Tetronic® respectivamente, son una familia de más de 50 diferentes macromoléculas anfifílicas.

Los poloxámeros son polímeros no iónicos cuya estructura consiste en una molécula central hidrofóbica de PPO flanqueada a sus lados por dos cadenas hidrofílicas de PEO, es decir, PEO_a-PPO_b-PEO_a (Figura 24a).

Las poloxaminas, en cambio, exhiben una estructura ligeramente diferente ya que son tri-bloques iónicos tetrafuncionales formados por cuatro bloques PEO_a-PPO_b unidos entre sí por un grupo central etilendiamina con dos aminas terciarias (Figura 24b) que, a diferencia de los poloxámeros, las dotan de sensibilidad dual al pH (Álvarez-Lorenzo et al., 2007).

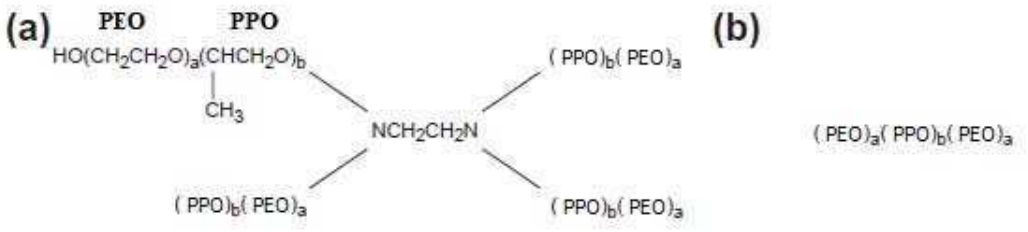


Figura 24: estructura general de A) poloxaminas y B) poloxámeros

Cada uno de estos co-polímeros se caracteriza por un distintivo balance hidrofílico-lipofílico (BHL) que depende de la cantidad de unidades de PEO y PPO. Los anfifilos PEO-PPO presentan una característica única ya que son capaces de disolverse en agua en forma de unímeros, o bien autoensamblarse formando micelas aumentando la hidrofobicidad del bloque PPO (Batrakova et al., 2004; Batrakova y Kabanov, 2008).

Algunos de estos co-polímeros ya cuentan con la aprobación de la FDA para ser utilizados en la formulación y administración de fármacos y en dispositivos biomédicos, debido a las propiedades de solubilización, la presencia de una alta gama de composiciones con diferentes proporciones PEO/PPO, la disponibilidad comercial, la alta biocompatibilidad, los bajos efectos secundarios *in vivo* y la capacidad para formar nanovehículos (Chiappeta y Sosnik, 2007). Estos co-polímeros son considerados por la FDA como "*Genarally recognized as safe*" (GRAS). Esta designación de "Generalmente reconocido como seguro" es empleada por la FDA para todo aquel producto químico o sustancia que se añade a los alimentos y/o medicamentos y es considerado seguro por expertos.

IV.2. Aplicaciones biomédicas y biofarmaceúticas de los co-polímeros de PEO-PPO

Desde su primera introducción como surfactantes en la década de 1950, se ha encontrado una amplia gama de aplicaciones de los co-polímeros en los campos farmacéutico y biomédico (Moghimi y Hunter, 2000), en particular, en el diseño y desarrollo de nuevos sistemas de liberación de drogas (*Drug Delivery System*).

Los poloxámeros y las poloxaminas, constituyen una alternativa atractiva para optimizar aspectos tecnológicos de fármacos y superar un amplio espectro de desventajas (bio)farmacéuticas. Los co-polímeros, en función de su estructura química, tienen la capacidad de disolver, atrapar, adsorber, unir o encapsular agentes terapéuticos a fin de lograr la liberación controlada de fármacos. En este contexto, estos surfactantes pueden ser considerados como soluciones ideales para la administración de diversos agentes, especialmente fármacos con baja solubilidad en agua y/o que sufren de una biodisponibilidad o estabilidad limitada en los compartimentos biológicos. Por ejemplo, más del 50% de las drogas son hidrofóbicas, y por su baja solubilidad en medios biológicos aparecen problemas de absorción en el tracto digestivo presentando así una limitada biodisponibilidad. Adicionalmente, muchos de estos fármacos son inestables en las condiciones de pH propias del medio gastrointestinal.

Debido a ello, una de las estrategias nanotecnológicas más prometedoras es la encapsulación de drogas hidrofóbicas en diversos nanovehículos, entre ellos, micelas poliméricas que son estructuras formadas por la agregación de moléculas poliméricas anfifílicas. Los co-polímeros segmentados de PEO-PPO son los biomateriales termo-sensibles formadores de micelas más extensamente estudiados (Chiappeta y Sosnik, 2007). Además, algunos miembros de esta clase de polímeros actúan como excipientes en la elaboración de adyuvantes para vacunas (Wilson-Welder et al., 2009) y como inhibidores de las proteínas ABC (Kabanov et al., 2002). También resultan adecuados para otras aplicaciones biomédicas, tales como la administración de fármacos, terapia génica e ingeniería de tejidos (Fusco et al., 2006).

Como se mencionó anteriormente, uno de los desafíos de la terapia contra el HBV y el HCC es revertir la resistencia celular al tratamiento debido a la sobre-expresión de algunos miembros de la superfamilia de transportadores ABC, como MDR1, MRP1 y BCRP. Según estudios recientes, estos surfactantes poliméricos en forma de unímeros actuarían inhibiendo la actividad de algunas de las bombas ABC, procurando lograr la

concentración intracelular adecuada de droga para que la misma sea eficaz (Kabanov et al., 2002; Alakhova et al., 2010; Cuestas et al., 2011).

Existe muy poca información sobre la actividad inhibitoria de las bombas ABC por parte de poloxaminas y poloxámeros, aunque se observó que la interacción del Pluronic® P85 con la membrana celular produce una inhibición significativa de la actividad ATPasa de MDR1 (Batrakova et al., 2001; Batrakova et al., 2003). También se han descripto otros mecanismos por los cuales los poloxámeros revertirían la MDR: (i) la incorporación de moléculas de co-polímero en las membranas y la disminución de la microviscosidad de la membrana plasmática, (ii) la depleción del ATP, (iii) la inhibición de las bombas, (iv) la inhibición del sistema de detoxificación glutatión GSH/GST (cuyos niveles de expresión están asociados con los niveles de expresión de MRP1) y (v) la liberación de drogas desde vesículas acídicas en el interior de células con fenotipo MDR (Batrakova y Kabanov, 2008). Además existen evidencias que demuestran que la acumulación intracelular de doxorrubicina y otros sustratos de MDR1 en células resistentes que sobre-expresan este transportador, puede ser aumentada mediante el tratamiento con Pluronic® P85 o L61 (Alakhov et al., 1996; Venne et al., 1996). Otros investigadores observaron que la máxima inhibición de la actividad funcional de MDR1 se obtiene con aquellos co-polímeros de PEO-PPO que presenten valores de BHL moderados o bajos, y un número de unidades de PPO entre 30 y 50 (Álvarez-Lorenzo et al., 2010). Asimismo, Cuestas y col. evaluaron el efecto de distintas poloxaminas sobre diversas proteínas ABC en líneas celulares hepáticas, y demostraron que algunos de los co-polímeros estudiados inhiben la actividad funcional de miembros de esta familia de transportadores (Cuestas et al., 2011). Esto último cobra relevancia ya que algunos de las proteínas ABC estudiadas son transportadores de drogas anti-HBV y anti-HCC.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

I. OBJETIVOS GENERALES

1) Desarrollar estrategias tecnológicas tendientes a optimizar la terapéutica anti-HCC y anti-HBV.
2) Estudiar los efectos farmacogenómicos y/o toxicogenómicos de materiales poliméricos empleados en la formulación de drogas antivirales y antitumorales.
3) Analizar el rol de la expresión de la proteína X del HBV en la regulación de la muerte celular programada, la proliferación y la inmortalización celular.
4) Aportar nuevos conocimientos a la patogénesis molecular de la infección por HBV analizando el rol de la expresión de la proteína X del virus sobre algunos miembros de la superfamilia ABC.

II. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

I. Desarrollar estrategias tecnológicas tendientes a optimizar la terapéutica anti-HCC y anti-HBV.

1. Estudiar el efecto de compuestos con potencial acción inhibitoria sobre BCRP en líneas celulares de HCC humano, en particular determinar la acción de co-polímeros que se utilizan en la formulación de fármacos antitumorales y antivirales.

2. Desarrollar estrategias tendientes a optimizar la terapéutica anti-HCC mediante el diseño de formulaciones droga/co-polímero que logren obtener la concentración de droga intracelular suficiente para mejorar su eficacia
3. Desarrollar estrategias tendientes a optimizar la terapéutica anti-HBV mediante el estudio de diferentes análogos de nucleósidos producidos por síntesis química en nuestro país y de co-polímeros de PEO-PPO en el contexto de un sistema *in vitro* de replicación del HBV.

II. Estudiar efectos farmacogenómicos y/o toxicogenómicos de materiales poliméricos empleados en la formulación de drogas antitumorales y antivirales.

1. Estudiar el efecto de co-polímeros que se emplean en la formulación de drogas antitumorales y antivirales en la apoptosis e inmortalización celular.

III. Analizar el rol de la expresión de la proteína X del HBV en la regulación de la muerte celular programada, la proliferación y la inmortalización celular.

1. Estudiar comparativamente los efectos de la expresión transitoria de la proteína X salvaje y mutada (Triple mutante I127T/K130M/V131I) del HBV sobre los niveles de ARNm de *bax*, *bcl-2* y telomerasa (*h-tert*).
2. Estudiar comparativamente los efectos de la expresión transitoria de la proteína X salvaje y mutada del HBV sobre los niveles de expresión de diversas proteínas involucradas en la regulación de la apoptosis, proliferación e inmortalización celular como c-Myc, caspasa 3 y 9, c-IAP1, c-IAP2, tanquirasa y ganquirina.
3. Evaluar comparativamente los efectos observados con los datos adquiridos en un sistema de replicación *in vitro* para HBV.

IV. Aportar nuevos conocimientos acerca de la patogénesis molecular de la infección por HBV analizando el rol de la expresión de la proteína X del virus sobre algunos miembros de la superfamilia ABC.

1. Estudiar comparativamente los efectos de la expresión transitoria de la proteína X salvaje y mutada del HBV sobre los niveles de ARNm y de proteína de MDR1, MRP1 y BCRP.
2. Evaluar comparativamente los efectos observados con los datos adquiridos en un sistema de replicación *in vitro* para HBV.

MATERIALES Y METODOLOGÍA

MATERIALES

I. CULTIVO DE CÉLULAS

I.1. Cultivo y mantenimiento de las líneas celulares

Se utilizaron las líneas celulares PLC/PRF/5, SKHep1, Huh7, HepG2 y HepG2.2.15, cuyas características se detallan a continuación.

PLC/PRF/5 (ATCC®: CRL-8024™) es una línea celular de origen epitelial establecida por Alexander y col. en 1976 a partir de un hepatocarcinoma humano (Alexander et al., 1976).

SKHep1 (ATCC®: HTB-52™) es una línea celular de origen epitelial derivada del fluido ascítico de un paciente caucásico con adenocarcinoma de hígado (Heffelfinger et al., 1992).

Huh7 es una línea celular derivada de un tumor de hígado que fue establecida por Nakabayashi y col. en 1982 (Yoo et al., 1995).

HepG2 (ATCC®: HB-8065™) es una línea celular de origen epitelial derivada de hepatocarcinoma humano.

HepG2.2.15 es una línea celular derivada de la HepG2 que se caracteriza por la expresión y replicación estable del HBV de subgenotipo D3. En dichas células el genoma del HBV se encuentra integrado al genoma celular (Sells et al., 1987).

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en medio completo (MC) formado por medio DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium, High Glucose*, Gibco) suplementado con 10% (v/v) de suero fetal bovino (SFB, BIOSER Argentina), en estufa a 37°C con una atmósfera húmeda de CO_2 5%.

Para el cultivo de las células HepG2.2.15, se adicionaron 200 μg/ml de Geneticina (G418, Gibco) al MC.

Para los subcultivos, las líneas celulares fueron lavadas con PBS 1X y tratadas con un reactivo comercial para disociación celular (*TrypLE®Express*, Gibco).

I.2. Criopreservación de las líneas celulares

Una vez que las células alcanzaron el 90% de confluencia, se cosecharon, se centrifugaron 5 min a 1200 rpm y luego se resuspendieron en medio de cultivo con 20% de SFB (v/v) y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO; Sigma). En cada criotubo se

colocaron alícuotas de 3.10^6 células y los mismos fueron colocados 20 min a 4°C, 2 h a -20°C y ON (*over night*) a -70°C, para luego ser transferidos a un tanque de N_2 líquido para su preservación.

II. CO-POLÍMEROS DE PEO-PPO

Se utilizaron las poloxaminas Tetronic® T904, T304 y T1107 y el poloxámero Pluronic® F127 (BASF Corporation). Las características principales de los mismos se resumen en la tabla 1.

Tabla 1: principales características de los co-polímeros de PEO-PPO utilizados

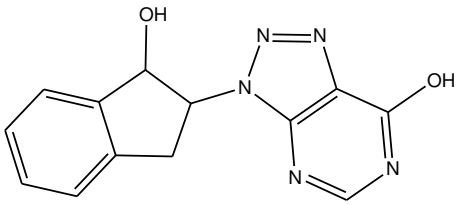
Co-polímero	PM	PPO	BHL
T904	6700 Da	68	12-18
T304	1650 Da	16	12-18
T1107	15000 Da	80	18-23
F127	12600 Da	65	18-23

PM: peso molecular; PPO: unidades de poli(óxido) de propileno; BHL: balance hidrofílico-lipofílico

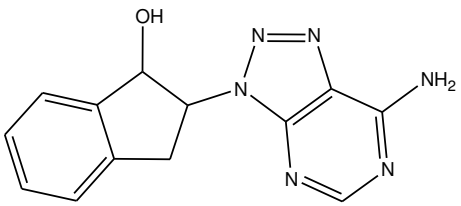
Las soluciones madre de los compuestos ya dializados y liofilizados, fueron preparadas en agua MiliQ y esterilizadas por filtrado (filtro de 0,22 μm). A partir de las mismas se prepararon diluciones de trabajo al 1; 0,1 y 0,01% (p/v) en MC.

III. ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS

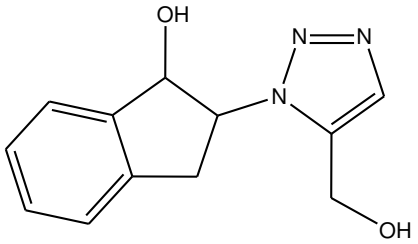
Los análogos de nucleósidos fueron obtenidos por síntesis química a partir del 2-amino-1-indanol sobre cuya estructura se construyó un anillo de purina, dos de azapurina y un triazol a partir del grupo amino (Figura 1). Los mismos fueron sintetizados por el grupo dirigido por la Dra. Albertina Moglioni (Cátedra de Química Medicinal, FFyB, UBA).



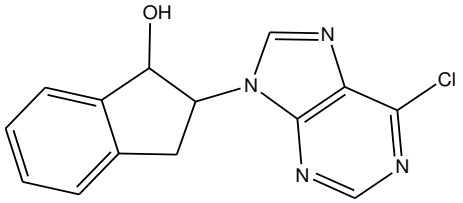
9-(1-hidroxi-Indan-2-il)-6-hidroxi-8-azapurina (Aza-OH)



9-(1-hidroxi-Indan-2-il)-6-amino-8-azapurina (Aza-NH)



2-(5-hidroximetil-[1,2,3]triazol-1-il)-1-indanol



9-(1-hidroxi-Indan-2-il)-6-cloro-purina

Figura 1: análogos nucleosídicos utilizados en el ensayo de actividad antiviral

I.

Desarrollo de estrategias tecnológicas tendientes a optimizar la terapéutica anti-HCC y anti-HBV

I.1. Estudiar el efecto de compuestos con potencial acción inhibitoria sobre BCRP en líneas celulares derivadas de HCC humano, en particular determinar la acción de co-polímeros que se utilizan en la formulación de fármacos antitumorales y antivirales.

I.1.1. Ensayos de citotoxicidad

Las células PLC/PRF/5 y SKHep1 se sembraron en placas de 96 pocillos ($2{,}0 \times 10^4$ céls/pocillo) y se incubaron en DMEM suplementado con 10% SFB (v/v) por 24 h a 37°C. Luego se removió el medio de cultivo y se lo reemplazó por la dilución de trabajo de cada co-polímero (0,01%; 0,1% y 1%). Las células fueron incubadas por 24 y 72 h a 37°C y la actividad citotóxica se determinó mediante el ensayo de MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium). Se midió la absorbancia a 495 nm mediante el *FlexStation* 3 (Molecular Devices).
El ensayo de MTS es un método colorimétrico basado en la reducción del MTS a formazán en presencia de metosulfato de fenazina (PMS). La cantidad de formazán medido por la absorbancia a 495 nm es directamente proporcional al número de células vivas. Las principales aplicaciones de este método son para el análisis de la viabilidad y proliferación celular.

La citotoxicidad de los co-polímeros se calculó según el porcentaje de células vivas con cada tratamiento de la siguiente manera:

$$\%Viabilidad = \frac{DO\ células\ tratadas}{DO\ células\ control} \times 100$$

DO: absorbancia a 495 nm

El ensayo se realizó por triplicado, teniendo en cuenta los controles positivos y negativos correspondientes. Como control negativo se emplearon células que fueron mantenidas con medio de cultivo sin la adición de co-polímero y como control positivo, células tratadas con DMSO al 2%.

También se cuantificaron los niveles de las transaminasas hepáticas aspartato aminotransferasa (AST) y alanina aminotransferasa (ALT) en los sobrenadantes de ambas líneas celulares. La medición de transaminasas se realizó mediante el método cinético basado en las recomendaciones de la IFCC (*International Federation of Clinical Chemistry*; Bergmeyer et al., 1986).

En todos los estudios posteriores, se excluyeron todas aquellas concentraciones de co-polímeros que resultaron citotóxicas por al menos una de las dos técnicas antes mencionadas (MTS y/o niveles de transaminasas hepáticas).

I.1.2. Efecto de los co-polímeros sobre BCRP

Las células PLC/PRF/5 y SKHep1 se sembraron en placas de 6 pocillos ($8{,}0x10^5$ y $6{,}0x10^5$céls/pocillo; respectivamente) y se incubaron en DMEM suplementado con 10% SFB (v/v) por 24 h a 37°C. Luego se removió el medio de cultivo y se lo reemplazó por la solución de cada co-polímero a las concentraciones no citotóxicas, determinadas según el punto anterior. En estas condiciones las células se incubaron por 24 y 72 h a 37°C. Posteriormente, se procedió a la extracción del ARN y de las proteínas totales según corresponda.

I.1.2.A. Estudio de los niveles de expresión de BCRP por *Western Blot* (WB)

I.1.2.A.1. Aislamiento y cuantificación de proteínas totales

Luego de 24 o 72 h de incubación con los co-polímeros se cosecharon las células de cada pocillo y se centrifugaron a 1200 rpm durante 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se agregó *buffer* de lisis (Tris 10 mM; NaCl 130 mM; EDTA 5 mM; Tritón X-100 1%) con inhibidores de proteasas tales como PMSF 0,05 mM, Leupeptina 0,05 mM y AEBSF 0,5 mM (Calbiochem). Los lisados se incubaron durante 30 min a 4°C. Luego se centrifugaron a 14000 rpm durante 15 min a 4°C, se colectó el sobrenadante en un nuevo tubo y se almacenó a -70°C para su posterior uso.

Los niveles de proteínas totales se cuantificaron utilizando el método de *Bradford* (Bradford, 1976). Para ello, se realizó una curva de concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA): 0,2 μg/μl; 0,4 μg/μl; 0,6 μg/μl; 0,8 μg/μl y 1 μg/μl y los extractos proteicos se diluyeron 1:10 con agua destilada. Sobre una placa de 96 pocillos, se sembraron 4 μl de cada dilución de BSA y de cada dilución de extracto proteico por duplicado. Como blanco de reacción se sembraron 4 μl de agua destilada.

Posteriormente, se agregaron 200 μl del reactivo de *Bradford* (BioRad) y luego de 5 min se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm en un lector de ELISA. Se realizó la curva de absorbancia en función de la concentración de BSA y por regresión

lineal se obtuvo la ecuación a partir de la cual se calcularon las concentraciones proteicas de cada muestra en µg/µl.

I.1.2.A.2. SDS-PAGE (Electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes) y WB

Los lisados proteicos obtenidos en el punto anterior se diluyeron a la concentración deseada con *buffer* de siembra (*Loading buffer*: Tris-HCl 50 mM; SDS 2%; azul de bromofenol 0,1%; glicerol 10%; pH 6,8) y se les agregó DTT 100 mM. Luego las muestras se calentaron durante 5 min a 100°C.
Se sembraron 50 µg de proteínas totales en cada calle y un marcador de peso molecular (*Prestained Protein Ladder*, Fermentas).
Las muestras se resolvieron en geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes a 120 V con *buffer* de electroforesis 1X (Tris 25 mM; Glicina 250 mM; SDS 0,1%; pH 8,3).

Transferencia a membranas de PVDF

Una vez finalizada la corrida electroforética, las proteínas fueron transferidas a una membrana de PVDF (Difluoruro de Polivinileno, Amersham Biosciences) utilizando *buffer* de transferencia (Glicina 39 mM; Tris Base 48 mM; SDS 0,037%; Metanol 20%) a 350 mA durante 90 min en frío. Para comprobar que la transferencia fue exitosa y que se cargaron concentraciones similares de proteína en cada calle, se tiñó la membrana con *Rojo Ponceau S* 0,1% en ácido acético glacial 5%. La decoloración de la membrana se llevó a cabo mediante varios lavados con *buffer* TBS-T (NaCl 150 mM; KCl 2,68 mM; Tris Base 24,7 mM; Tween-20 0,05% v/v; pH 7,4).

Inmunodetección

Previo a la detección de las proteínas de interés, se bloquearon potenciales sitios de unión inespecífica de los anticuerpos mediante la incubación de la membrana durante un tiempo mínimo de 1 h a temperatura ambiente con una solución de bloqueo con leche descremada en polvo 10% en TBS-T y con agitación suave y constante. Una vez finalizado el bloqueo, las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron, con agitación suave, toda la noche a 4°C con los diferentes anticuerpos primarios diluidos en leche descremada en polvo 5% en TBS-T (Tabla 2).

Tabla 2: anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmunodetección

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
BCRP (1/300; Alexis Biochemicals)	Anti-ratón (1/10000; Amersham Biosciences)
β-Actina (1/1000; Sigma Aldrich)	Anti-ratón (1/10000; Amersham Biosciences)

Posteriormente, se realizaron 3 lavados de 10 min con TBS-T y se incubaron las membranas con los anticuerpos secundarios conjugados con peroxidasa de rábano (HRP) (Tabla 2), también diluidos en leche descremada en polvo 5% en TBS-T, según el anticuerpo primario utilizado. La incubación se realizó durante 3 h a temperatura ambiente y con agitación. Finalmente, se lavaron 3 veces las membranas con TBS-T durante 10 min y se realizó un último lavado con TBS durante 3-5 min.

Las proteínas se detectaron incubando las membranas con *ECL Plus* (Amersham Biosciences). Este reactivo produce una reacción química catalizada por la peroxidasa que produce quimioluminiscencia, la cual se reveló sobre placas radiográficas (AGFA).

La intensidad relativa de bandas se cuantificó por densitometría mediante el programa *ImageJ* (NIH, Bethesda, Maryland, USA) y los resultados se normalizaron con β-Actina. Cada experimento se realizó al menos por triplicado.

I.1.2.B. Análisis del nivel de ARNm de *bcrp* por RT-PCR en tiempo real (RT-qPCR)

Luego de realizar los tratamientos tal como se detalla en la sección I.1.2 se procedió al aislamiento del ARN total de ambas líneas celulares.

I.1.2.B.1. Extracción de ARN

Para aislar el ARN total de las células, se utilizó el reactivo TRIzol® *Reagent* (Life Technologies Corp.).

En primer lugar, se realizó un lavado de los cultivos celulares con PBS. Luego, las células se cosecharon y se agregaron 500 µl de TRIzol. Se homogeneizó la muestra y la suspensión celular se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se agregaron 200 µl de cloroformo, se agitó vigorosamente con *vórtex* durante 15 seg y se incubó a temperatura ambiente durante 2-3 min. Para separar las fases, se centrifugaron las muestras a 12000 g durante 15 min a 4°C y se conservó la fase superior acuosa que es la que contiene el ARN. Para precipitar el ARN, se agregó 1 µl de glicógeno como co-

precipitante y 500 µl de isopropanol. Se incubaron las muestras durante 10 min a temperatura ambiente y luego se centrifugaron a 12000 g durante 10 min a 4°C. Se removió el sobrenadante de cada tubo y se lavó cada *pellet* de ARN con etanol 75%, centrifugando a 7500 g durante 5 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y, para eliminar trazas remanentes de etanol, se dejó secar el *pellet* de ARN a 37°C durante 5-10 min. Finalmente, cada ARN se resuspendió en 20 µl de agua estéril libre de ARNasas y se conservaron las muestras a -70°C.

Para conocer la concentración de ARN se preparó una dilución 1:100 de cada muestra y se midió la absorbancia a 260 nm (A_{260}) y 280 nm (A_{280}) en un espectrofotómetro (BioRad). El grado de pureza de las muestras se calculó mediante el cociente entre A_{260} y A_{280}, considerando que las relaciones comprendidas entre 1,8-2 son las óptimas.
Una vez obtenidos los valores de absorbancia, se calculó la concentración de ARN mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Conc. de ARN } (\mu g/\mu l) = (DO^{*} \text{ x factor de dilución x } 40)/1000$$

[*] 1 densidad óptica (DO) a 260 nm = 40 µg/µl de ARN. (La DO debe estar comprendida entre 0,4 y 0,8).

I.1.2.B.2. Síntesis de ADNc

El ADNc se sintetizó a partir del ARN total por medio de una transcripción inversa (RT), utilizando como *primers* ADNs sintéticos de 6 nucleótidos con secuencias aleatorias de las bases A, T, C y G (hexámeros; dN6). Para ello, se preparó una mezcla de reacción como se indica en la siguiente tabla:

Tabla 3: protocolo para la transcripción inversa o RT

Reactivo	Volumen / tubo
ARN (dil. 1µg/10 µl)	10 µl
dN6(100 ng/µl)	2 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl
5 min a 65°C	
Buffer 5X (Invitrogen)	4 µl
DTT (0,1M)	2 µl
MMLV (transcriptasa inversa)	1 µl
60 min a 37°C	
45 min a 95°C	

El ADNc obtenido se conservó a -20°C para su posterior uso.

I.1.2.B.3. qPCR

El ADNc se amplificó por qPCR. Para ello, se utilizó 1 µl de ADNc (dilución 1:10) obtenido en la RT al cual se le agregó la mezcla de reacción que contenía 12,5 µl de mezcla real 2X (Biodynamics); 9,5 µl de agua destilada y 2 µl del *mix* de *primers* específicos (Conc. final 5 mM) en un volumen final de 25 µl.
Los *primers* fueron diseñados mediante el uso del *software Beacon Designer 4.0* (*PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, USA*) y su secuencia se detalla en la Tabla 4.

Tabla 4: secuencia de *primers* utilizados en la qPCR

Gen	*Primer forward*	*Primer reverse*
bcrp	5'TATAGCTCAGATCATTGTCACAGTC3'	5'GTTGGTCGTCAGGAAGAAGAG3'
18S	5'TAACCCGTTGAACCCCATT3'	5'CCATCCAATCGGTAGTAGCG3'

Las muestras se amplificaron mediante el uso del *Rotor-Gene*™*6000* (Qiagen, USA) utilizando el siguiente programa de ciclados:

Desnaturalización: 3 min a 95°C

20 seg a 95°C
1 min a 60°C } 40 ciclos

Curva de *Melting*: de 70 a 95°C cada 0,2°C

Cada reacción se realizó por triplicado y cada experimento se repitió 3 veces. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el *software Rotor-Gene Q 1.7.94* (Qiagen, USA).
La medida de la expresión génica por medio de RT-qPCR es una cuantificación relativa, en la que se compara la expresión de los genes de interés respecto a la expresión de un gen constitutivo que no varía en las condiciones del experimento (control endógeno o *housekeeping gene*). La expresión génica relativa se calculó usando el método ΔΔCt.
Para cada gen se obtuvo un valor de Ct (Ciclo Umbral, *Threshold Cycle*) que se define como el ciclo en el que el fragmento amplificado emite una señal de fluorescencia sobre el umbral establecido. Se calculó el promedio de los valores de Ct obtenidos para el gen

a estudiar (*target)* y para el gen de referencia o *housekeeping gene* (en este estudio se utilizó el gen *18S*) y se normalizó el valor promedio de cada Ct de la siguiente manera:

$$\Delta Ct_{(control)} = Ct \text{ gen } target_{(control)} - Ct \text{ } housekeeping\ gene_{(control)}$$
$$\Delta Ct_{(tratam.)} = Ct \text{ gen } target_{(tratam.)} - Ct \text{ } housekeeping\ gene_{(tratam.)}$$

A continuación se normalizó la expresión de cada valor de ΔCt respecto del promedio obtenido en el ensayo para todas las muestras. De ese modo, se elimina la variación entre las muestras debida a la PCR.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{(tratam.)} - \Delta Ct_{(control)}$$

Finalmente, se realizó la conversión a medidas relativas de inducción (I) para poder comparar entre los diferentes experimentos y de donde se elimina el logaritmo equivalente al 100% de eficiencia de amplificación:

$$I = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

I.1.2.C. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Estudios previos de Alakhova y col., demostraron que el Pluronic® P85 localizado en la mitocondria produce la inhibición de la cadena respiratoria, promoviendo la depleción de ATP y por lo tanto, la inhibición de MDR1 (Alakhova et al., 2010). Según este mecanismo la mitocondria cumpliría un rol fundamental en la quimiosensibilización del fenotipo MDR.

A fin de poder profundizar sobre los posibles mecanismos de acción de los co-polímeros estudiados en la inhibición de BCRP, se analizó mediante citometría de flujo la capacidad de los mismos de afectar el $\Delta\Psi_m$.

Los cambios en este potencial de membrana pueden ser evaluados utilizando la tinción con Rho123, un colorante fluorescente catiónico lipofílico que se acumula en las mitocondrias de células viables (Johnson et al., 1980). Una reducción en la tinción con Rho123 indica una reducción en el $\Delta\Psi_m$, lo cual constituye un parámetro de la desestabilización que sufre la membrana mitocondrial.

Se trabajó con las líneas celulares PLC/PRF/5 y SKHep1, las cuales se cultivaron en placas de 6 pocillos ($8{,}0 \times 10^5$ y $6{,}0 \times 10^5$ céls/pocillo; respectivamente) por 24 y 72 h en las condiciones que se describen en la sección I.1.2.

En ambas líneas celulares se ensayaron todas las concentraciones de co-polímeros no citotóxicas de acuerdo al ensayo MTS y a la evaluación de las transaminasas hepáticas en los sobrenadantes celulares.

Como control negativo del tratamiento, se emplearon células que fueron mantenidas con medio de cultivo sin la adición de co-polímero y para una correcta medición en el citómetro de flujo, se emplearon células sin marcar de cada tratamiento como control negativo de marcación.

Para llevar a cabo dicho experimento, se recolectó 1,5 ml del sobrenadante de cada pocillo. Luego las células de cada pocillo se cosecharon utilizando 1 ml del sobrenadante recolectado inicialmente. Se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con PBS 1X. Nuevamente se realizó una centrifugación a 1000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió cada *pellet* en 1 ml de *binding buffer* 1X (Hepes/NaOH pH = 7,4 10 mM; NaCl 140 mM y $CaCl_2$ 2,5 mM) y se centrifugaron a 1000 rpm durante 5 min. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 900 µl de PBS 1X. Se separaron 270 µl de muestra al cual se le agregaron 270 µl de *buffer efflux* [RPMI 1640; 10% SFB (v/v); 0,2% de Rho123 (1 mg/ml en DMSO; Chemicon)] y se incubó en oscuridad a 37°C durante 15 min.

La intensidad de fluorescencia de la Rho123 se determinó mediante citometría de flujo utilizando el citómetro FACScan (Becton Dickinson) y se adquirieron 10.000 eventos en cada caso. El análisis de células con un $\Delta\Psi_m$ reducido se realizó mediante el programa *WinMDI 2.9* a partir de los histogramas obtenidos en los que se representa el número de eventos en función de la fluorescencia emitida por la Rho123. Los datos obtenidos se expresaron como la media ± desvío estándar (SD) de tres experimentos independientes.

I.2. Desarrollar estrategias tendientes a optimizar la terapéutica anti-HCC mediante el diseño de formulaciones droga/co-polímero que logren obtener la concentración de droga intracelular suficiente para mejorar su eficacia

El clorhidrato de doxorrubicina es sustrato de BCRP por lo cual en este trabajo fue utilizado como droga antitumoral modelo para evaluar la capacidad de los co-polímeros de PEO y PPO estudiados de revertir la resistencia a dicho antitumoral.

La doxorrubicina (Laboratorios Rontag) fue cedida gentilmente por la Dra. Elba Vázquez (FCEyN, UBA).

I.2.1. Determinación del Índice de Reversión de la Resistencia (IRR)

I.2.1.A. Cálculo de la IC_{50} de la doxorrubicina y de la doxorrubicina en presencia de diferentes co-polímeros de PEO-PPO

Para calcular este índice, las células PLC/PRF/5 y SKHep1 se incubaron en placas de 96 pocillos ($2{,}0x10^4$ céls/pocillo) con DMEM suplementado con 10% de SFB (v/v) durante 24 h a 37°C. Luego, se agregaron concentraciones crecientes de doxorrubicina (0,05-500 nM) y se incubaron durante 2 h. Se descartó el sobrenadante, se agregó medio de cultivo fresco a cada pocillo y se incubaron las células por 72 h. Pasado ese tiempo, se agregaron 20 µl de MTS a cada pocillo y la placa se incubó 1 h a 37°C. La absorbancia a 490 nm se determinó en un lector *FlexStation3* (Molecular Devices). Cada experimento se realizó por triplicado.

La concentración de droga que disminuye la viabilidad celular en un 50% comparado con los cultivos libres de droga (IC_{50}) se determinó mediante gráficos de absorbancia en función del logaritmo de la concentración de doxorrubicina. Se estudió además la capacidad de los co-polímeros de revertir la resistencia al antitumoral doxorrubicina calculando el IRR definido como el cociente entre la IC_{50} de doxorrubicina y la IC_{50} de doxorrubicina/co-polímero (Mazel et al., 2001; Batrakova et al., 1999):

$$IRR = \frac{IC_{50}(Doxo)}{IC_{50}(Doxo + co - polímero)}$$

Para determinar el IRR, se sembró una placa de 96 pocillos ($2{,}0x10^4$ céls/pocillo) con cada línea celular a ensayar y se incubaron con DMEM suplementado con 10% de SFB (v/v) por 24 h a 37°C. Se descartó el sobrenadante y se expusieron las células a doxorrubicina (a las mismas concentraciones utilizadas anteriormente) o a las distintas formulaciones doxorrubicina/co-polímero durante 2 h y luego se incubaron las células en medio de cultivo por 72 h. La citotoxicidad se determinó mediante el ensayo de MTS. Las concentraciones de co-polímero utilizadas en este ensayo fueron aquellas que resultaron no citotóxicas de acuerdo al ensayo MTS y/o a la evaluación de las transaminasas hepáticas en los sobrenadantes celulares.

I.3. Desarrollar estrategias tendientes a optimizar la terapéutica anti-HBV mediante el estudio de diferentes análogos de nucleósidos producidos por síntesis química en nuestro país y de co-polímeros de PEO-PPO en el contexto de un sistema in vitro de replicación del HBV

I.3.1. Estudio de la actividad antiviral de diferentes análogos de nucleósidos producidos por síntesis química

Para estos ensayos se utilizó la línea celular HepG2.2.15 que constitutivamente produce partículas de HBV. La misma se obtuvo a partir de la transfección de la línea celular HepG2 con un plásmido conteniendo el genoma completo del HBV. Esta línea celular fue cedida gentilmente por el Prof. Dr. M. Nassal (Hospital Universitario de Freiburg, Alemania).

Se verificó la existencia de replicación viral en la línea celular mediante la determinación de la carga viral y de los antígenos HBsAg y HBeAg en los sobrenadantes de los cultivos celulares por métodos comerciales. Para ello, se tomó una alícuota de 1,5 ml de los sobrenadantes provenientes de los cultivos y se cuantificó el ADN del HBV (*Real Time PCR*), utilizando *primers* y sondas de hibridación específicas para la región "*pre-core/core*" con el kit comercial COBAS Ampliprep/COBAS Taq Man HBV (ROCHE Diagnostics). Los antígenos virales fueron determinados en forma cualitativa y semicuantitativa mediante el método CMIA (Inmunoensayo quimioluminiscente, técnica de micropartículas).

Para estudiar el efecto de los diferentes análogos de nucleósidos las células HepG2.2.15 se sembraron en placas de 24 pocillos (5,0 x 10^5 céls/pocillo) y se incubaron en DMEM suplementado con 10% de SFB (v/v) y 200 µg/ml de Geneticina por 24 h a 37°C. Posteriormente, se agregaron distintas concentraciones de diversos análogos nucleosídicos racémicos (1,5-100 µM) y se incubó a 37°C durante 6 días. El sobrenadante se recolectó cada 48 h y se agregó medio de cultivo nuevo con cada concentración de análogo nucleosídico. Luego de ese tiempo, se determinó la citotoxicidad celular mediante el ensayo MTS. En los ensayos donde el análogo nucleosídico mostró citotoxicidad nula se estudió la eficacia de estos antivirales a la concentración más alta durante 6 días, determinando en los sobrenadantes celulares los niveles de HBsAg, HBeAg y la carga viral del HBV mediante un método comercial (COBAS Ampliprep/COBAS Taq Man HBV, ROCHE Diagnostics).

I.3.2. Estudio de la actividad antiviral de co-polímeros de PEO-PPO

Las células HepG2.2.15, se sembraron en placas de 24 pocillos (5,0 x 10^5 céls/pocillo) y se incubaron en DMEM suplementado con 10% de SFB (v/v) y 200 μg/ml de Geneticina por 24 h a 37°C. Luego de ese tiempo, se removió el medio de cultivo y se lo reemplazó por la dilución de cada co-polímero a fin de determinar la citotoxicidad de los mismos a diferentes concentraciones (0,01; 0,1 y 1%) mediante el ensayo MTS. En los ensayos donde se observó citotoxicidad nula, se estudió la eficacia de los co-polímeros a la concentración más alta determinando en los sobrenadantes celulares los niveles de HBsAg, HBeAg y la carga viral del HBV, utilizando los equipos comerciales mencionados anteriormente.

Para ello, se sembraron las células en placas de 24 pocillos (5,0 x 10^5 céls/pocillo) y se incubaron en DMEM suplementado con 10% de SFB (v/v) por 24 h a 37°C. Posteriormente, se agregaron al medio de cultivo suplementado con 5% de SFB (v/v) los co-polímeros citocompatibles y se incubó a 37°C durante 6 días. El sobrenadante, se recolectó cada 48 h y se agregó medio de cultivo nuevo con cada solución de co-polímero.

II.

Estudio de los efectos farmacogenómicos y/o toxicogenómicos de materiales poliméricos empleados en la formulación de drogas antitumorales y antivirales

II.1. Estudiar el efecto de co-polímeros que se emplean en la formulación de drogas antitumorales y antivirales en la apoptosis e inmortalización celular

Como se mencionó anteriormente, la denominación "Generalmente reconocido como seguro" o "*Generally recognized as safe*" (GRAS por sus siglas en inglés) es una designación de la *Food and Drug Administration* (FDA, USA) que se le asigna a una sustancia química añadida a los alimentos o medicamentos y que es considerada inerte por expertos.

Los co-polímeros estudiados en esta tesis son considerados GRAS y cuentan con la aprobación de la FDA para ser utilizados como componentes en la formulación de medicamentos en humanos, en dispositivos médicos e incluso como adyuvantes en la formulación de vacunas de última generación.

Para determinar el efecto de los co-polímeros en la apoptosis e inmortalización celular se evaluaron los niveles de apoptosis temprana y tardía /necrosis mediante la marcación con Anexina V-FITC/IP y el porcentaje de células hipodiploides mediante la tinción con ioduro de propidio (IP); así como la expresión relativa de los ARNm de *bax*, *bcl-2* y *h-tert* mediante una RT-PCR *Multiplex*. Para ello, las células PLC/PRF/5 y SKHep1 se sembraron en placas de 6 pocillos ($8{,}0x10^5$ y $6{,}0x10^5$ céls/pocillo; respectivamente) y se incubaron en DMEM suplementado con 10% SFB (v/v) por 24 h a 37°C. Luego se removió el medio de cultivo y se lo remplazó por la solución de cada co-polímero a las concentraciones no citotóxicas. Las células fueron incubadas por 24 y 72 h a 37°C.

II.1.1. Ensayos de apoptosis

II.1.1.A. Determinación de la apoptosis por Anexina V-FITC/IP

En células no apoptóticas, el fosfolípido de membrana fosfatidilserina (PS) se encuentra ubicado en la cara interna de la membrana plasmática. La detección de estímulos pro-apoptóticos induce la translocación de la PS hacia la cara externa de la membrana plasmática. Este fenómeno de externalización ocurre en las primeras etapas de la apoptosis, incluso antes de la fragmentación del ADN y de la pérdida final de la integridad de la membrana plasmática, que ocurre como fase terminal tanto en el contexto de procesos apoptóticos como necróticos (Figura 2).

Aprovechando esta característica y sumado a la existencia de la Anexina V que es una proteína que se une a fosfolípidos y, en particular, posee gran afinidad por la PS en presencia de Ca^{2+}, se utilizan complejos conjugados de Anexina V-FITC que permiten

la detección del proceso de apoptosis en sus etapas iniciales (van Engeland et al., 1996; Vermes et al., 1995; Koopman et al., 1994) y el monitoreo mediante citometría de flujo. Algunos equipos comerciales, por ejemplo el *Annexin V-FITC apoptosis detection Kit II* (BD Biosciences, EE.UU.) utilizado en la presente tesis, aprovechan las características antes descriptas en combinación con el colorante vital Ioduro de propidio (IP) lo que permite identificar células en distintos estadios.

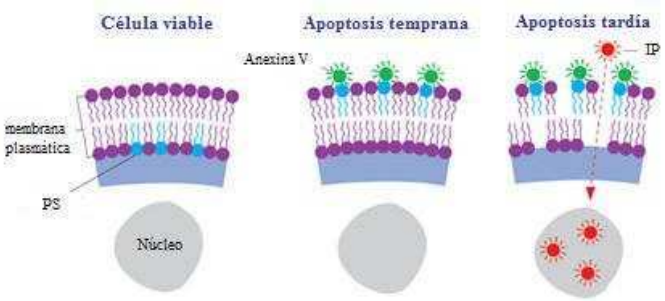


Figura 2: representación del ensayo de Anexina V-FITC/IP

Para llevar a cabo este ensayo, se levantó la monocapa de células cultivadas antes mencionada y se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, se lavó el *pellet* con PBS 1X y se centrifugó nuevamente a 1000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y cada *pellet* se resuspendió en 1 ml de *binding buffer* 1X. Se tomaron 100 µl de cada muestra y en cada una se agregaron 3 µl de Anexina V-FITC y 3 µl de IP. Se homogeneizó la mezcla con *vórtex* y se incubó 15 min en oscuridad y a temperatura ambiente. Al momento de realizar la medición en el citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson), se adicionaron 200 µl de *binding buffer* 1X.
Se determinaron los valores de fluorescencia mediante citometría de flujo dentro de la hora subsiguiente.

Como control negativo se emplearon células que fueron mantenidas con medio de cultivo sin la adición de co-polímero.
Para la correcta medición en el citómetro de flujo se emplearon:

a. Para la compensación: células apoptóticas marcadas sólo con Anexina V-FITC o sólo con IP. A estas células se las incubó con medio de cultivo y se adicionó 2% de DMSO para inducir la apoptosis.

b. Control negativo de marcación: células sin marcar de cada tratamiento.

Se evaluó un mínimo de 10.000 eventos. Se seleccionó la población celular a estudiar a partir de los gráficos de granulación celular SSC (dispersión lateral) en función del tamaño celular FSC (dispersión frontal) para excluir los detritos celulares.

El análisis de las poblaciones celulares en apoptosis temprana y apoptosis tardía/necrosis se realizó a partir de los gráficos de la fluorescencia emitida por el IP en función de la fluorescencia emitida por la Anexina V-FITC, utilizando el programa *WinMDI 2.9*.

II.1.1.B. Determinación de la hipodiploidía por IP

El ensayo de citometría de flujo con IP se basa en una de las principales características de las células apoptóticas que es la fragmentación del ADN y, consecuentemente, la pérdida del contenido de ADN nuclear (Riccardi y Nicoletti, 2006). El uso de un fluorocromo como el IP, que es un agente intercalante fluorescente, hace posible que se obtenga en forma rápida y precisa una evaluación del estado del ADN celular mediante análisis por citometría de flujo.

Para realizar este experimento, se recolectó 1,5 ml del sobrenadante de cada pocillo. Luego las células de cada pocillo se cosecharon utilizando 1 ml del sobrenadante recolectado inicialmente. Se centrifugó a 1000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con PBS 1X. Nuevamente se realizó una centrifugación a 1000 rpm durante 5 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Se resuspendió cada *pellet* en 900 µl de PBS 1X. Se tomaron 270 µl de cada muestra a las cuales se le agregaron 630 µl de etanol absoluto y se incubó toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras a 1500 rpm durante 5 min y se realizaron 2 lavados con 1 ml de PBS 1X. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió cada *pellet* en 100 µl de solución de hipodiploidía (Citrato de sodio 0,2%; Tritón X-100 0,2% v/v). Se agregaron 100 µl de IP (50 µg/ml) y se dejó incubando toda la noche en oscuridad a 4°C. Al día siguiente, se determinó el valor de intensidad de fluorescencia del colorante mediante citometría de flujo y se evaluaron un mínimo de 10.000 eventos en cada caso. El porcentaje de células apoptóticas se determinó mediante el programa *WinMDI 2.9* a partir de los histogramas obtenidos, en los cuales se representaba el número de eventos en función de la fluorescencia emitida por el IP.

II.1.2. RT-PCR *Multiplex*

La extracción del ARN y síntesis del ADNc se realizó de acuerdo al protocolo descripto en las secciones I.1.2.B.1 y I.1.2.B.2.

La PCR *Multiplex* es una variante de la técnica de PCR en la cual se emplean 2 o más pares de *primers* en un mismo tubo a fin de amplificar simultáneamente múltiples segmentos de ADN.
La amplificación con cada par de *primers*, excepto *β-actina*, se realizó en una mezcla de reacción (volumen final de 20 µl) como se muestra en la tabla 5.

Tabla 5: mezcla de reacción, *primers* y ciclos utilizados en la RT-PCR *Multiplex*

Reactivo	Volumen / tubo
H_2O	13,2 µl
Buffer 10X	2 µl
dNTPs (10 mM)	0,4 µl
$MgCl_2$ (50 mM)	0,8 µl
Primers bax (10 µM)	0,2 µl de F + 0,2 µl de R
Primers bcl-2 (10 µM)	0,2 µl de F + 0,2 µl de R
Primers h-tert (10 µM)	0,3 µl de F + 0,3 µl de R
Taq ADN polimerasa (5 U/µl) (Life Technologies)	0,2 µl
ADNc	2 µl
Ciclo 1: 1 ciclo de 3 min a 94°C, 6 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 63°C y 30 seg a 72°C	
Primers β-actina (10 µM)	0,25 µl de F + 0,25 µl de R
Ciclo 2: 1 ciclo de 3 min a 94°C, 9 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 63°C y 30' seg a 72°C	
Ciclo 3: 21 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 58°C y 30 seg a 72°C	

Los ciclos se llevaron a cabo en el *DNA Thermal Cycler*. Luego de la primera amplificación, se agregaron los *primers* de *β-actina* y se procedió a realizar el segundo y tercer ciclado. El número total de ciclos fue de 36 ciclos para *bax*, *bcl-2* y *h-tert* y 30 ciclos para *β-actina*.
La secuencia de *primers* específicos para cada uno de los genes analizados por RT-PCR *Multiplex* se detalla en la Tabla 6.

Tabla 6: *primers* utilizados en la RT-PCR *Multiplex*

Gen	*Primer forward*	*Primer reverse*
bax	5'ACCAAGAAGCTGAGCGAGTGTC3'	5'ACAAAGATGGTCACGGTCTGCC3'
bcl-2	5'TGCACCTGACGCCCTTCAC3'	5'AGACAGCCAGGAGAAATCAAACAG3'
h-tert	5'TCCTGCGTTTGGATGATTTCTTG3'	5'GCCGCACCAGGGGAATAGGC3'
β-actina	5'GGACCTGACTGACTACCTCATGAA3'	5'GATCCACATCTGCTGGAAGGTGG3'

Los productos de la RT-PCR *Multiplex* se sembraron en un gel de agarosa al 1,5% en *buffer* TBE teñido con bromuro de etidio (0,5 μg/ml), junto a un marcador de peso molecular de 100 pb. El fraccionamiento electroforético se realizó a 100 V durante 1 h. El tamaño esperado de los productos de PCR es de 523 pb para *β-actina*, 365 pb para *bax* (puede verse una segunda banda de aproximadamente 400 pb que se debe a un *splicing* alternativo), 293 pb para *bcl-2* y 209 pb para *h-tert*.

Luego de la corrida electroforética se visualizaron las bandas en un transiluminador de UV y posteriormente se realizó la captura de imágenes. La expresión relativa de los ARNm de *bax*, *bcl-2* y *h-tert* se relativizó con *β-actina*. Para ello, se realizó un análisis comparativo del área de las bandas con el programa *ImageJ* (NIH, Bethesda, Maryland, USA).

III.

Análisis del rol de la expresión de la proteína X del HBV en la regulación de la muerte celular programada, la proliferación y la inmortalización celular

III.1. Estudiar comparativamente los efectos de la expresión de la proteína X salvaje y mutada del HBV sobre los niveles de ARNm de bax, bcl-2 y telomerasa (h-tert)

En primer lugar se procedió a transfectar las células Huh7 para la expresión transitoria de las proteínas X salvaje (X*sal*) y X mutada (X*mut*) del HBV. Para ello, se emplearon los plásmidos que contienen los genes X*sal* y X*mut*, clonados en el vector de expresión pT-REx-DEST31™ (Life Technologies Corp.) los cuales fueron cedidos por la Dra. María Luján Cuestas.

pExp-*Xsal*: *Gen que codifica para la proteína X salvaje del HBV de genotipo F, clonado en el "vector de destino" pT-REx-DEST31™ (vector de expresión)*
pExp-*Xmut*: *Gen que codifica para la proteína X mutada del HBV (I127T, K130M, V131I), de genotipo F, también clonado en el "vector de destino" pT-REx-DEST31™ (vector de expresión)*

La línea celular Huh7 fue transfectada con los plásmidos pExp-X*sal* y pExp-X*mut* utilizando liposomas catiónicos (Lipofectamina®2000, *Life Tecnologies Corp*.).
Se sembraron $1{,}4 \times 10^6$ células en frascos T25, con medio de cultivo sin antibiótico. Luego de 24 h, cuando la monocapa celular se encontraba en un 90-95% de confluencia, las células fueron transfectadas con los complejos formados por los liposomas catiónicos y el plásmido pExp-*Xsal* o pExp-*Xmut* según la siguiente relación: 8 µg de ADN: 20 µl de Lipofectamina. Como control se utilizaron cultivos celulares tratados solamente con Lipofectamina. Transcurridas 24 y 72 h post-transfección, los cultivos celulares fueron disgregados con tripsina, lavados dos veces con PBS 1X, y parte del *pellet* fue guardado a -70° C para la posterior determinación de la proteína X y de las proteínas c-Myc, c-IAP1, c-IAP2, caspasa 3 y 9, tanquirasa y ganquirina mediante *WB*. La otra parte del *pellet* fue guardada en Trizol para la posterior extracción del ARN para realizar la RT-PCR *Multiplex* para cuantificar los ARNm de *bax*, *bcl-2* y *h-tert*. Para estudiar los niveles de ARNm de *bax*, *bcl-2* y *h-tert*, se utilizó el mismo procedimiento de RT-PCR *Multiplex* descripto en la sección II.1.2.

III.2. Estudiar comparativamente los efectos de la expresión de la proteína X salvaje y mutada del HBV sobre los niveles de expresión de diversas proteínas involucradas en la regulación de la apoptosis, proliferación e inmortalización celular como c-Myc, caspasa 3 y 9, c-IAP1, c-IAP2, tanquirasa y ganquirina

Se utilizaron los *pellets* de células Huh7 transfectadas en la sección III.1 y se procedió al aislamiento y cuantificación de proteínas totales siguiendo el protocolo descripto en la sección I.1.2.A.1.

Para evaluar el efecto de la expresión de las proteínas X*sal* y X*mut* del HBV sobre c-Myc, caspasas 3 y 9, c-IAP1, c-IAP2, tanquirasa y ganquirina, se realizó un WB de acuerdo al procedimiento descripto en la sección I.1.2.A.2.

En este caso, los anticuerpos primarios y secundarios utilizados fueron los siguientes (Tabla 7):

Tabla 7: anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmunodetección

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
HBxAg (1/1000; Alexis Biochemicals)	Anti-ratón (1/10000; Sigma Aldrich)
c-Myc (1/50; Santa Cruz Biotechnology)	Anti-conejo (1/5000; Sigma Aldrich)
Caspasa-3 (1/100; Sigma Aldrich)	Anti-ratón (1/10000; Sigma Aldrich)
Caspasa-9 (1/300; Sigma Aldrich)	Anti-ratón (1/10000; Sigma Aldrich)
c-IAP1 (1/50; Santa Cruz Biotechnology)	Anti-conejo (1/5000; Sigma Aldrich)
c-IAP2 (1/50; Santa Cruz Biotechnology)	Anti-conejo (1/5000; Sigma Aldrich)
Tanquirasa (1/50; Santa Cruz Biotechnology)	Anti-conejo (1/5000; Sigma Aldrich)
Ganquirina (1/50; Santa Cruz Biotechnology)	Anti-conejo (1/5000; Sigma Aldrich)
β-Actina (1/1000; Sigma Aldrich)	Anti-ratón (1/10000; Sigma Aldrich)

Recuperación de membranas (*Stripping*)

En algunos casos se ensayaron distintas proteínas sobre una misma membrana. Para ello se procedió a la recuperación de la membrana mediante el uso de una solución de *stripping* (3125 µl de *buffer* Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8; 100 mM de β-mercaptoetanol; 2% p/v de SDS; H_2O destilada c.s.p. 50 ml) para la remoción de anticuerpos. Se colocó la membrana con la solución de *stripping* a 50°C durante 30 min y se bloquearon las membranas con leche descremada en polvo 10% en TBS-T durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. Una vez finalizado el bloqueo, se realizaron 2 lavados

con TBS-T durante 10 min y finalmente, se procedió a incubar cada membrana con los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes.

La intensidad relativa de bandas se cuantificó por densitometría mediante el programa *ImageJ* (NIH, Bethesda, Maryland, USA) y los resultados se normalizaron con β-Actina. Cada experimento se realizó al menos por triplicado.

III.3. Evaluar comparativamente los efectos observados con los datos adquiridos en un sistema de replicación in vitro para HBV

Para estos ensayos se utilizó la línea celular HepG2.2.15 que constitutivamente produce partículas de HBV. Como control negativo se empleó la línea celular HepG2 que no contiene replicón de HBV.

Las líneas celulares HepG2 y HepG2.2.15 se sembraron en placas de 6 pocillos ($5{,}0 \times 10^5$ y $7{,}0 \times 10^5$ céls/pocillo, respectivamente) y se incubaron en DMEM suplementado con 10% de SFB (v/v) por 24 h a 37°C. En el caso de las células del replicón, se adicionó al medio de cultivo 200 μg/ml de Geneticina.

Se evaluaron los niveles de ARNm de *bax*, *bcl-2* y *h-tert* siguiendo el mismo procedimiento de RT-PCR *Multiplex* descripto en la sección II.1.2.

Para determinar los niveles de expresión de las proteínas c-Myc, c-IAP1, c-IAP2, caspasas 3 y 9, ganquirina y tanquirasa en células del replicón de HBV se procedió al aislamiento y cuantificación de proteínas totales de acuerdo al procedimiento descripto en la sección I.1.2.A.1 y los WB se realizaron según el protocolo descripto en la sección I.1.2.A.2. Los anticuerpos utilizados en este ensayo fueron los mismos que los que se detallan en la sección anterior (III.2).

IV.

Aporte de nuevos conocimientos acerca de la patogénesis molecular de la infección por HBV analizando el rol de la expresión de la proteína X del virus sobre algunos miembros de la superfamilia ABC

IV.1. Estudiar comparativamente los efectos de la expresión de la proteína X salvaje y mutada del HBV sobre los niveles de expresión de MDR1, MRP1 y BCRP

La línea celular Huh7 fue transfectada con los plásmidos pExp-X*sal* y pExp-X*mut* según el protocolo descripto en la sección III.1.

IV.1.1. Análisis de los niveles de ARNm de *mdr1*, *mrp1* y *bcrp* por RT-qPCR

La extracción del ARNm y síntesis del ADNc se realizó de acuerdo al protocolo descripto en las secciones I.1.2.B.1 y I.1.2.B.2.
El ADNc se amplificó por qPCR siguiendo el procedimiento descripto en la sección I.1.2.B.3. Los *primers* fueron diseñados mediante el uso del *software Beacon Designer 4.0* (*PREMIER Biosoft International, Palo Alto, CA, USA*) y su secuencia se detalla en la Tabla 8.

Tabla 8: secuencia de *primers* utilizados en la qPCR

Gen	*Primer forward*	*Primer reverse*
mdr1	5'TGCTCAGACAGGATGTGAGTTG3'	5'AATTACAGCAAGCCTGGAAC3'
mrp1	5'GCCAAGAAGGAGGAGACC3'	5'AGGAAGATGCTGAGGAAGG3'
bcrp	5'TATAGCTCAGATCATTGTCACAGTC3'	5'GTTGGTCGTCAGGAAGAAGAG3'
18S	5'TAACCCGTTGAACCCCATT3'	5'CCATCCAATCGGTAGTAGCG3'

Las muestras se amplificaron mediante el uso del *Rotor-Gene*™*6000* (Qiagen, USA) utilizando el siguiente programa de ciclados:

Desnaturalización: 3 min a 95°C

20 seg a 95°C
1 min a 60°C } 40 ciclos

Curva de *Melting*: de 70 a 95°C cada 0,2°C

Cada reacción se realizó por triplicado y cada experimento se repitió 3 veces. Los datos obtenidos se analizaron utilizando el *software Rotor-Gene Q 1.7.94* (Qiagen, USA).
La expresión génica relativa se calculó usando el método ΔΔCt.

IV.1.2. Estudio de los niveles de expresión de proteínas MDR1, MRP1 y BCRP por WB

El procedimiento para aislar y cuantificar proteínas totales se realizó de la misma manera que el descripto en la sección I.1.2.A.1.

Para determinar los niveles de expresión de las proteínas MDR1, MRP1 y BCRP por *WB*, se realizó el mismo procedimiento que el descripto en la sección I.1.2.A.2.
En este caso, los anticuerpos primarios y secundarios utilizados fueron los que se detallan en la Tabla 9:

Tabla 9: anticuerpos primarios y secundarios utilizados para la inmunodetección por WB

Anticuerpo primario	Anticuerpo secundario
MDR1 (1/100; Alexis Biochemicals)	Anti-ratón (1/10000; Sigma Aldrich)
MRP1 (1/1000; Alexis Biochemicals)	Anti-conejo (1/5000; Sigma Aldrich)
BCRP (1/300; Alexis Biochemicals)	Anti-ratón (1/10000; Sigma Aldrich)
β-Actina (1/1000; Sigma Aldrich)	Anti-ratón (1/10000; Sigma Aldrich)

La intensidad relativa de bandas se cuantificó por densitometría mediante el programa *ImageJ* (NIH, Bethesda, Maryland, USA) y los resultados se normalizaron con β-Actina. Cada experimento se realizó al menos por triplicado.

IV.2. *Evaluar comparativamente los efectos observados con los datos adquiridos en un sistema de replicación in vitro para HBV*

Para estos ensayos se utilizó la línea celular HepG2.2.15 que constitutivamente produce partículas de HBV. Como control negativo se empleó la línea celular HepG2 que no contiene replicón de HBV.
Las líneas celulares HepG2 y HepG2.2.15 se sembraron en placas de 6 pocillos ($5{,}0 \times 10^5$ y $7{,}0 \times 10^5$ céls/pocillo, respectivamente) y se incubaron en DMEM suplementado con 10% de SFB (v/v) por 24 h a 37°C. En el caso de las células del replicón, se adicionó al medio de cultivo 200 μg/ml de Geneticina.
Para evaluar los niveles de ARNm de *mdr1*, *mrp1* y *bcrp*, se realizó el mismo procedimiento que el descripto en la sección IV.I.1.
Luego se determinaron los niveles de expresión de las proteínas MDR1, MRP1 y BCRP, siguiendo el mismo procedimiento que el descripto en la sección IV.I.2.

V.

Análisis estadístico

Todos los experimentos se realizaron al menos por triplicado y los datos se analizaron mediante *TWO-WAY ANOVA* usando el *Bonferroni's post-test* para comparar el promedio de las réplicas.

En todos los casos, los resultados obtenidos se expresaron como el promedio ± SD y las diferencias respecto a los controles (*) fueron consideradas estadísticamente significativas para $p<0,05$. Para el análisis de resultados se utilizó el programa *GraphPad Prism* (versión 6.0 para Windows; GraphPad Software, La Jolla California, USA).

RESULTADOS

I.

Desarrollo de estrategias tecnológicas tendientes a optimizar la terapéutica anti-HCC y anti-HBV

I.1. Estudiar el efecto de compuestos con potencial acción inhibitoria sobre BCRP en líneas celulares derivadas de HCC humano, en particular determinar la acción de co-polímeros que se utilizan en la formulación de fármacos antitumorales y antivirales

I.1.1. Ensayos de citotoxicidad

Se estudió la citotoxicidad de las poloxaminas T904, T304 y T1107 y el poloxámero F127 en las líneas celulares SKHep1 y PLC/PRF/5 mediante el ensayo de MTS, luego de 24 y 72 h de exposición a los co-polímeros en diferentes concentraciones (0,01; 0,1 y 1%).

Se determinó que el T1107 en todas las concentraciones estudiadas, el T904 0,01%, el T304 0,01- 0,1% y el F127 0,01-0,1% resultaron ser citocompatibles en las dos líneas celulares estudiadas. Además, para la línea celular PLC/PRF/5 el F127 al 1% resultó no citotóxico. Estos mismos co-polímeros y concentraciones arrojaron valores de transaminasas hepáticas (AST y ALT) en los sobrenadantes celulares semejantes a los del control sin tratamiento (Tabla 1).

Tabla 1: efecto de las poloxaminas T904, T304 y T1107 y del poloxámero F127 (0,01; 0,1 y 1%) sobre los niveles de transaminasas en las células PLC/PRF/5 y SKHep1 (* p < 0,05).

PLC/PRF/5		24 h		72 h	
		AST (UI/l)	ALT (UI/l)	AST (UI/l)	ALT (UI/l)
Control		9,0 ± 0,1	7,0 ± 0,1	10,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1
T904	0,01%	8,0 ± 0,1	5,0 ± 0,1	10,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1
	0,1%	**20,0 ± 0,6***	8,0 ± 0,1	**37,0 ± 0,6***	1,0 ± 0,1
	1%	**46,0 ± 0,5***	6,0 ± 0,2	**110,0 ± 0,8***	1,0 ± 0,1
T304	0,01%	8,0 ± 0,1	5,0 ± 0,1	6,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
	0,1%	7,0 ± 0,2	5,0 ± 0,3	7,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
	1%	8,0 ± 0,2	4,0 ± 0,1	**15,0 ± 0,2***	1,0 ± 0,2
T1107	0,01%	9,0 ± 0,2	5,0 ± 0,1	6,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1
	0,1%	9,0 ± 0,1	4,0 ± 0,2	7,0 ± 0,3	1,0± 0,1
	1%	10,0 ± 0,3	4,0 ± 0,1	8,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
F127	0,01%	7,0 ± 0,1	5,0 ± 0,1	7,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
	0,1%	8,0 ± 0,1	4,0 ± 0,2	9,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1
	1%	9,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	10,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1

SKHep1		24 h		72 h	
		AST (UI/l)	ALT (UI/l)	AST (UI/l)	ALT (UI/l)
Control		6,0 ± 0,2	3,0 ± 0,2	4,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1
T904	0,01%	5,0 ± 0,2	3,0 ± 0,3	2,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
	0,1%	**29,0 ± 0,6***	3,0 ± 0,2	**9,0 ± 0,6***	1,0 ± 0,1
	1%	**50,0 ± 0,7***	3,0 ± 0,3	**13,0 ± 0,5***	1,0 ± 0,1
T304	0,01%	2,0 ± 0,1	6,0 ± 0,4	2,0 ± 0,1	6,0 ± 0,4
	0,1%	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1
	1%	4,0 ± 0,3	3,0 ± 0,1	**9,0 ± 0,2***	1,0 ± 0,1
T1107	0,01%	4,0 ± 0,1	3,0 ± 0,3	3,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
	0,1%	5,0 ± 0,4	3,0 ± 0,2	4,0 ± 0,1	1,0 ± 0,1
	1%	6,0 ± 0,1	2,0 ± 0,2	4,0 ± 0,3	1,0 ± 0,1
F127	0,01%	3,0 ± 0,1	3,0 ± 0,2	5,0 ± 0,2	1,0 ± 0,1
	0,1%	5,0 ± 0,2	3,0 ± 0,1	5,0 ± 0,2	1,0 ± 0,2
	1%	5,0 ± 0,2	4,0 ± 0,2	**24,0 ± 0,7***	1,0 ± 0,1

A partir de los resultados de citotoxicidad obtenidos, se excluyeron todas aquellas concentraciones de co-polímeros que resultaron ser citotóxicas por al menos una de las técnicas empleadas (T904 0,1-1%; T304 1% y F127 1% sólo para la línea SKHep1).

I.1.2. Efecto de los co-polímeros sobre BCRP

I.1.2.A. Estudio de los niveles de expresión de BCRP por WB

Para evaluar el efecto de las poloxaminas y el poloxámero estudiados sobre la expresión de la proteína BCRP, se realizaron ensayos de WB utilizando solamente aquellos co-polímeros no citotóxicos a las 24 y 72 h de tratamiento.

Los resultados muestran que la expresión de BCRP depende de la línea celular, la concentración y el tipo de surfactante y del tiempo de exposición a los mismos.

La expresión de BCRP disminuyó significativamente en células PLC/PRF/5 tratadas con T304 0,01 y 0,1% (0,617 ± 0,004 y 0,608 ± 0,017; respectivamente), T1107 0,01% (0,653 ± 0,001) y F127 0,01-1% (0,522 ± 0,051; 0,434 ± 0,008 y 0,535 ± 0,003; respectivamente), pero dicha expresión aumentó en aquellas células tratadas con T1107 0,1 y 1% (1,113 ± 0,022 y 1,234 ± 0,046; respectivamente) a las 24 h luego del tratamiento. Sin embargo, a las 72 h los niveles de BCRP disminuyeron significativamente en las células PLC/PRF/5 tratadas con T904 0,01% (0,808 ± 0,023), T304 0,01 y 0,1% (0,065 ± 0,019 y 0,436 ± 0,033; respectivamente), T1107 0,01-1%

(0,646 ± 0,025; 0,664 ± 0,006 y 0,455 ± 0,045; respectivamente) y F127 0,01-1% (0,038 ± 0,013; 0,644 ± 0,028 y 0,789 ± 0,016; respectivamente) (Figuras 1 y 2).

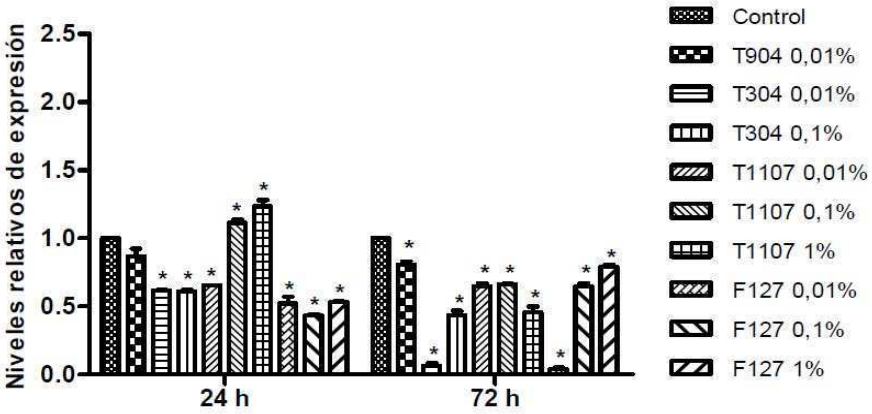


Figura 1: análisis de la expresión de BCRP por WB en PLC/PRF/5. La extracción de proteínas se realizó en ambas líneas celulares tratadas con diferentes concentraciones de los co-polímeros T904, T304, T1107 y F127 a las 24 y 72 h. Se sembraron cantidades equivalentes de proteína en cada caso. Los niveles relativos de proteína se normalizaron con β-Actina. El valor del control se designó arbitrariamente como 1 (* $p < 0,05$).

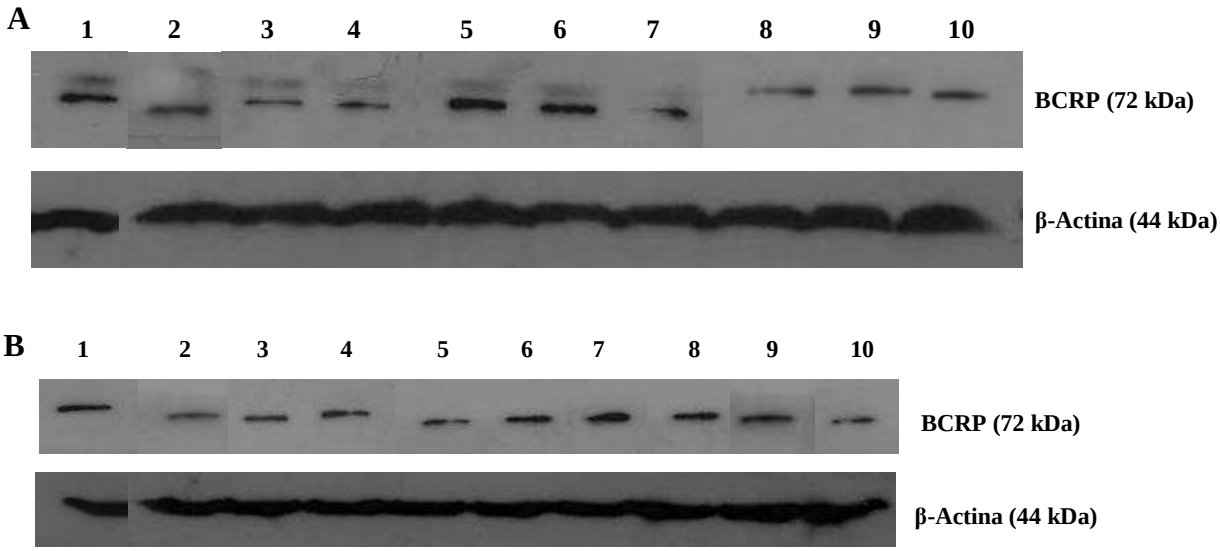


Figura 2: análisis de la expresión de BCRP por WB en células PLC/PRF/5 tratadas con los diferentes co-polímeros durante A) 24 h y B) 72 h. Se sembraron cantidades equivalentes de proteína en cada caso. Los niveles relativos de proteína se normalizaron con β-Actina.
1: Control; 2: T904 0,01%; 3 y 4: T304 0,1 y 0,01%; respectivamente; 5, 6 y 7: T1107 1; 0,1 y 0,01%; respectivamente y 8, 9 y 10: F127 1; 0,1 y 0,01%; respectivamente.

En las células SKHep1, BCRP disminuyó significativamente a las 24 h en el caso del T1107 0,01-1% (0,490 ± 0,062; 0,205 ± 0,047 y 0,344 ± 0,019; respectivamente) y F127 0,01 y 0,1% (0,110 ± 0,006 y 0,312 ± 0,015; respectivamente), pero a las 72 h se

observó que los niveles de la proteína aumentaron considerablemente con los mismos co-polímeros. Solo se observó una disminución en la expresión de BCRP en el caso del T304 0,1% (0,691 ± 0,037) (Figuras 3 y 4).

La mayor inhibición en la expresión de BCRP en PLC/PRF/5 fue producida por el T304 0,01% (0,065 ± 0,019) y el F127 0,01% (0,038 ± 0,013) a las 72 h post-tratamiento, mientras que en el caso de las células SKHep1 dicha inhibición se logró a las 24 h con los co-polímeros T1107 0,1% (0,205 ± 0,047) y F127 0,01% (0,110 ± 0,006).

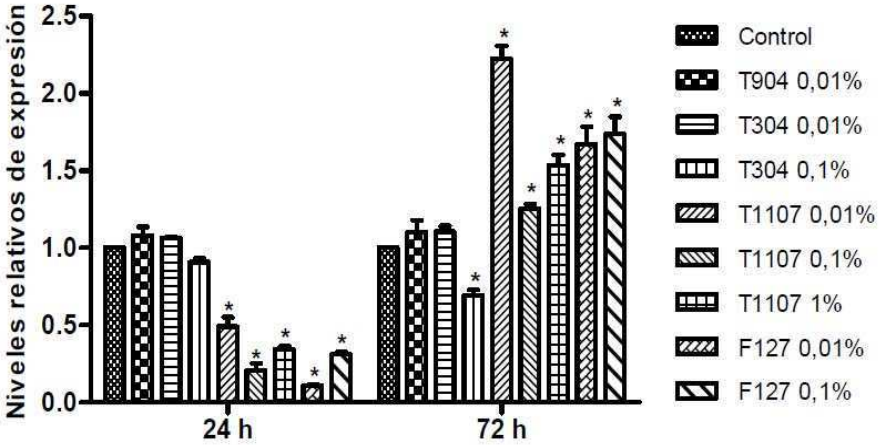


Figura 3: análisis de la expresión de BCRP por WB en SKHep1. La extracción de proteínas se realizó en ambas líneas celulares tratadas con diferentes concentraciones de los co-polímeros T904, T304, T1107 y F127 a las 24 y 72 h. Se sembraron cantidades equivalentes de proteína en cada caso. Los niveles relativos de proteína se normalizaron con β-Actina. El valor del control se designó arbitrariamente como 1 (* $p < 0,05$).

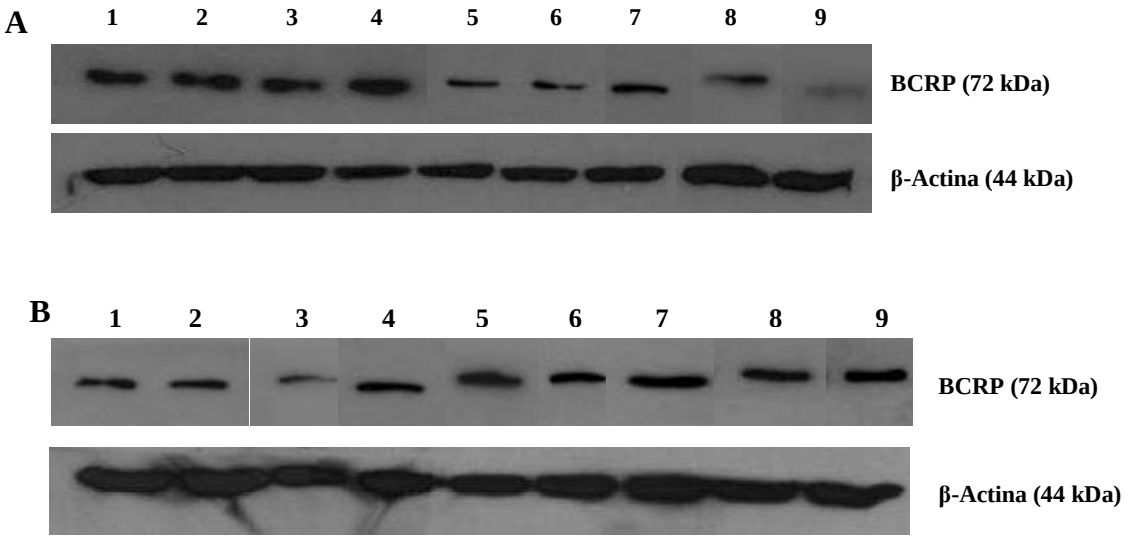
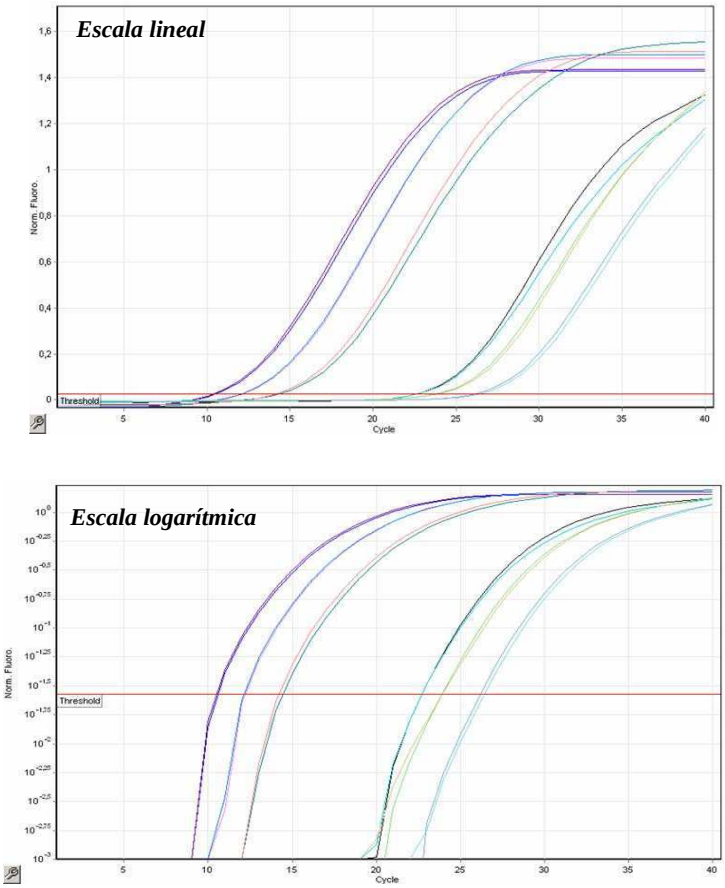


Figura 4: análisis de la expresión de BCRP por WB en células SKHep1 tratadas con los diferentes co-polímeros durante A) 24 h y B) 72 h. Se sembraron cantidades equivalentes de proteína en cada caso. Los niveles relativos de proteína se normalizaron con β-Actina.
1: Control; 2: T904 0,01%; 3 y 4: T304 0,1 y 0,01%; respectivamente; 5, 6 y 7: T1107 1; 0,1 y 0,01%; respectivamente y 8, 9 y 10: F127 0,1 y 0,01%; respectivamente.

I.1.2.B. Análisis del nivel de ARNm de *bcrp* por RT-qPCR

Con el fin de evaluar si el efecto de los diferentes co-polímeros sobre la expresión de BCRP se produce a nivel transcripcional, se investigaron los niveles de ARNm de *bcrp* por RT-qPCR en ambas líneas celulares luego de 24 y 72 h de tratamiento. Se seleccionaron para este estudio aquellos co-polímeros que mostraron el mayor efecto de inhibición en la expresión de BCRP por la técnica de WB (T304 0,01%, T1107 0,1% y F127 0,01%).

En primera instancia se realizaron las curvas de calibración correspondientes a cada uno de los *primers* utilizados (Figuras 5 y 6). Esto permitió determinar si la eficiencia de las reacciones es cercana a 1 y si las mismas se correspondieron con la eficiencia de la reacción de amplificación del gen *housekeeping (18S)*, que fue utilizado para relativizar todos los resultados.



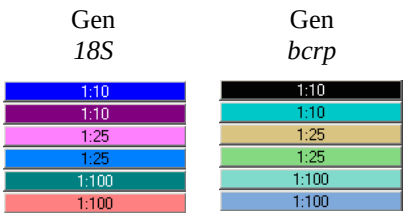


Figura 5: curva de calibración realizada con los *primers* para el gen *18S* y *bcrp*, donde se muestran las diluciones de las muestras con los colores respectivos de las curvas para cada gen. Las diluciones fueron realizadas por duplicado.

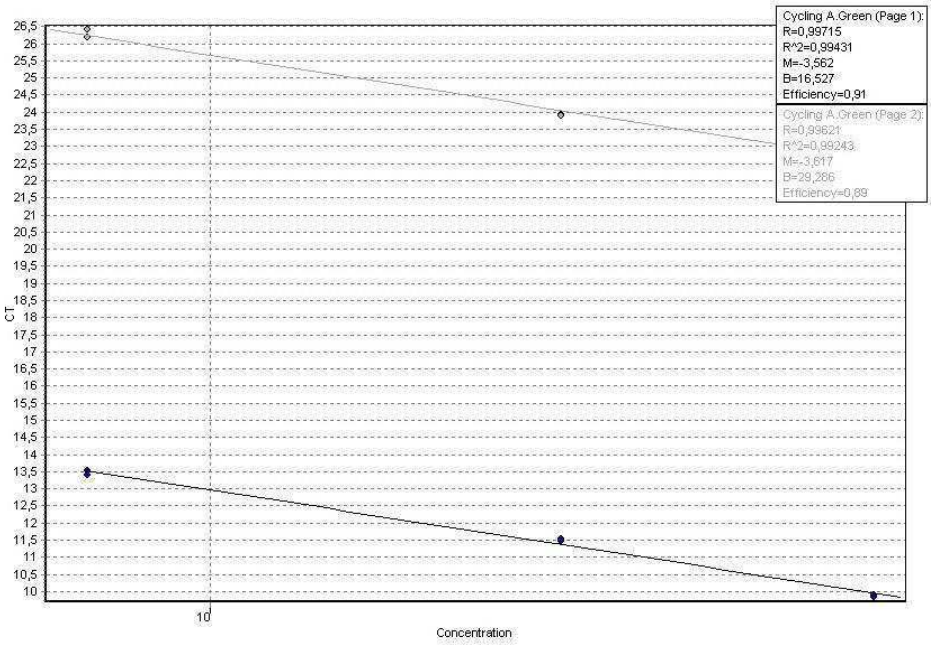


Figura 6: rectas correspondientes a las curvas de calibración de la figura 5. La recta inferior y el recuadro superior (negro) corresponden a la eficiencia del *primer* para *18S*. La recta superior y el recuadro inferior (gris) corresponden a la eficiencia obtenida utilizando el *primer* para *bcrp*.

La eficiencia de las reacciones de qPCR utilizando los distintos pares de *primers* para ambas líneas celulares fue cercana a 1, y se correspondió con la eficiencia del gen *housekeeping 18S*. Por lo tanto, las condiciones de ciclado y concentración utilizadas en la amplificación de cada uno de los genes se mantuvieron sin modificación alguna.

Como se observa en la figura 7A, los resultados mostraron que no hubo diferencias significativas en los niveles de ARNm de *bcrp* en las células PLC/PRF/5 expuestas a cada co-polímero ensayado a las 24 y 72 h. Sin embargo, cuando la línea celular SKHep1 fue expuesta a esos mismos co-polímeros, se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en los niveles del transcripto de *bcrp* con T304 0,01% y F127 0,01% (0,37 ± 0,01 y 0,42 ± 0,06; respectivamente) a las 24 h post-tratamiento (Figura 7B).

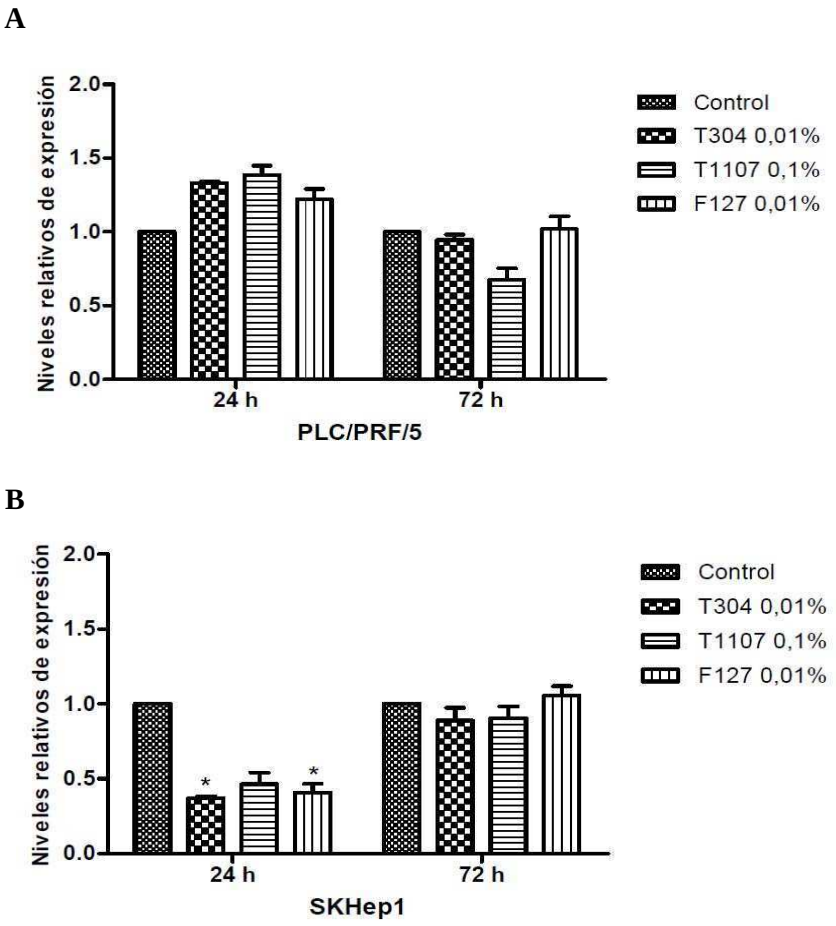


Figura 7: niveles relativos de expresión del ARNm de *bcrp* determinados por qPCR en A) PLC/PRF/5 y B) SKHep1 a las 24 y 72 h luego del tratamiento con los diferentes co-polímeros. El valor del control se designó arbitrariamente como 1 (* $p < 0,05$).

I.1.2.C. Determinación del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

Con el objeto de determinar uno de los posibles mecanismos de los co-polímeros estudiados en la inhibición de BCRP, se analizó mediante citometría de flujo la capacidad de los mismos de afectar el $\Delta\Psi_m$. Los niveles de acumulación de rodamina (Rho123) dentro de la mitocondria son susceptibles de ser evaluados por citometría de flujo dado que este colorante tiene la capacidad de emitir fluorescencia al ser excitado con la longitud de onda adecuada. Los resultados que se obtienen son histogramas como el de la figura 8.

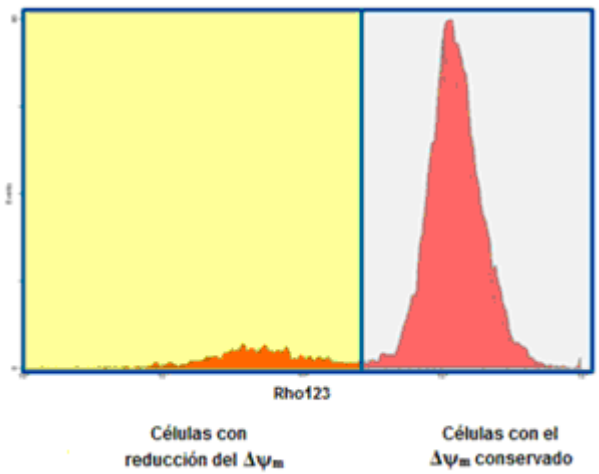


Figura 8: representación de un histograma obtenido en un ensayo de $\Delta\Psi_m$ mediante el uso del programa *WinMDI 2.9*.

El $\Delta\Psi_m$ fue cuantificado usando Rho123 en ambas líneas celulares derivadas de HCC, luego del tratamiento con los co-polímeros estudiados a las concentraciones no citotóxicas por 24 y 72 h que mostraron efecto sobre la expresión de BCRP. Los datos obtenidos se expresaron como el porcentaje de células con el $\Delta\Psi_m$ disminuido (media ± desvío estándar [SD]) de tres experimentos independientes.

Los resultados muestran que a las 24 h, ninguno de los co-polímeros ensayados afectó significativamente el $\Delta\Psi_m$ comparado con los controles sin tratar, en las células PLC/PRF/5 (Figura 9A y Tabla 2). A diferencia de ello, las células SKHep1 expuestas durante 24 h a T904 0,01%; T304 0,1%; T1107 0,1-1% y F127 0,1% mostraron una acumulación estadísticamente significativa de Rho123, indicando una disminución del $\Delta\Psi_m$ (Figura 9B y Tabla 2). Sin embargo, a las 72 h post-tratamiento, tanto en PLC/PRF/5 como en SKHep1 los polímeros T904 0,01%; T304 0,1%; T1107 0,01%-1% y F127 0,1% afectaron significativamente el $\Delta\Psi_m$. Lo mismo ocurrió solo con el F127 0,01 y 1% en la línea PLC/PRF/5 (Figura 9 y Tabla 2).

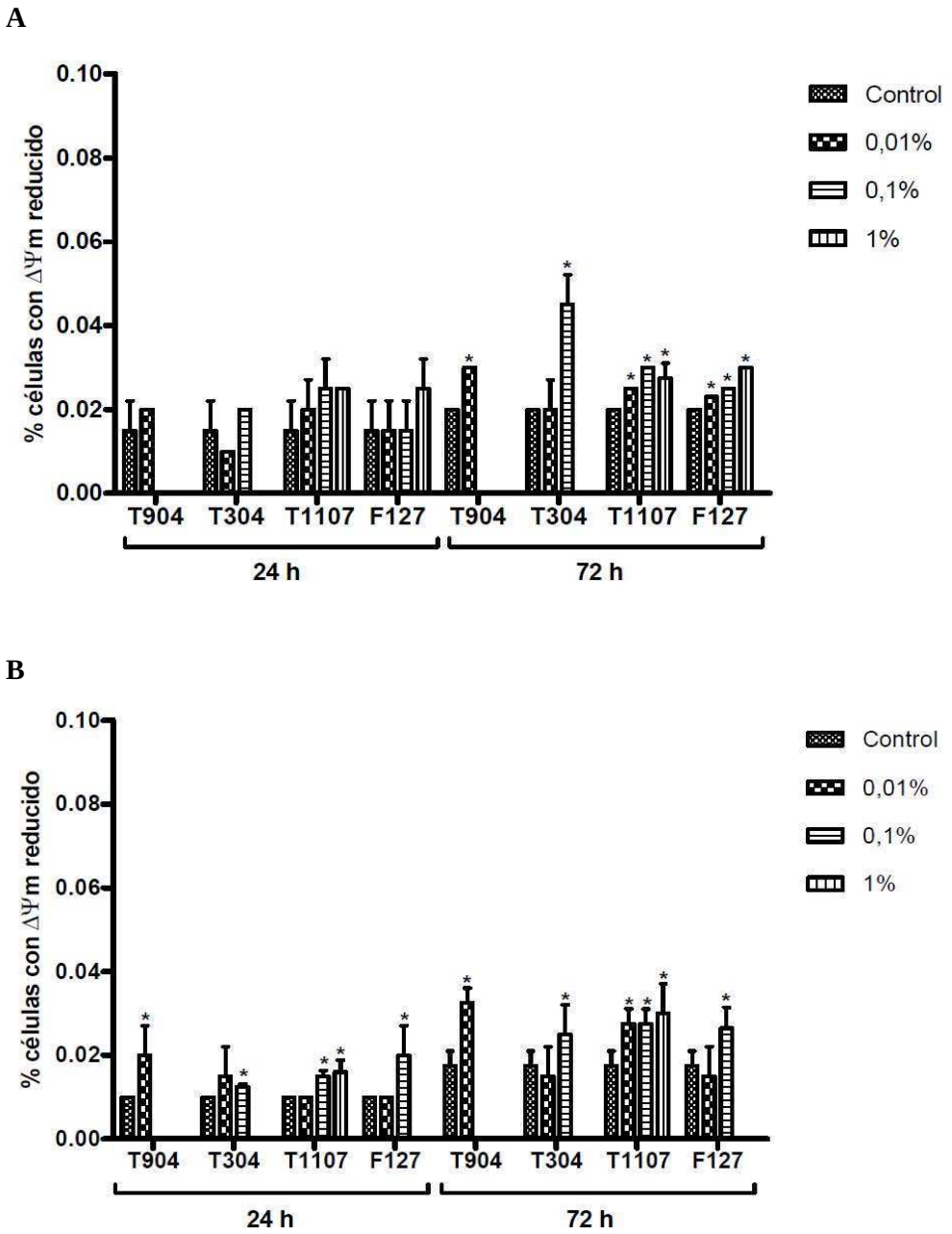


Figura 9: efecto del T904, T304, T1107 y F127 en el $\Delta\Psi_m$ a las 24 y 72 h de tratamiento en A) PLC/PRF/5; B) SKHep1. (* $p < 0,05$).

Tabla 2: efecto de los diferentes co-polímeros en el $\Delta\Psi_m$ en las líneas celulares PLC/PRF/ y SKHep1 a las 24 y 72 h de tratamiento (* p < 0,05).

		PLC/PRF/5		SKHep1	
		24 h	**72 h**	**24 h**	**72 h**
Control		0,015 ± 0,007	0,020 ± 0,001	0,010 ± 0,001	0,018 ± 0,004
T904	0,01%	0,020 ± 0,001	**0,030 ± 0,001***	0,020 ± 0,007	**0,032 ± 0,004***
T304	0,01%	0,010 ± 0,001	0,020 ± 0,007	0,015 ± 0,007	0,015 ± 0,007
	0,1%	0,020 ± 0,001	**0,045 ± 0,007***	**0,013 ± 0,001***	**0,025 ± 0,007***
T1107	0,01%	0,020 ± 0,007	**0,025 ± 0,001***	0,010 ± 0,001	**0,027 ± 0,004***
	0,1%	0,025 ± 0,007	**0,030 ± 0,001***	**0,015 ± 0,001***	**0,027 ± 0,004***
	1%	0,025 ± 0,001	**0,027 ± 0,004***	**0,016 ± 0,003***	**0,030 ± 0,007***
F127	0,01%	0,015 ± 0,007	**0,023 ± 0,001***	0,010 ± 0,001	0,015 ± 0,007
	0,1%	0,015 ± 0,007	**0,025 ± 0,001***	**0,020 ± 0,007***	**0,026 ± 0,010***
	1%	0,025 ± 0,007	**0,030 ± 0,001***	NC	NC

NC: No corresponde.

I.2. Desarrollar estrategias tendientes a optimizar la terapéutica anti-HCC mediante el diseño de formulaciones droga/co-polímero que logren obtener la concentración de droga intracelular suficiente para mejorar su eficacia

I.2.1. Determinación del Índice de Reversión de la Resistencia (IRR)

I.2.1.A. Cálculo de la IC_{50} de la doxorrubicina y de la doxorrubicina en presencia de diferentes co-polímeros

Para determinar el efecto de los co-polímeros de PEO-PPO sobre la citotoxicidad de la doxorrubicina en ambas líneas celulares de HCC, se determinó la IC_{50} de dicha droga sola y en presencia de los diferentes co-polímeros estudiados.

Como se observa en la figura 10 y tabla 3, la IC_{50} de la doxorrubicina disminuyó en presencia de los diferentes co-polímeros estudiados en ambas líneas celulares.

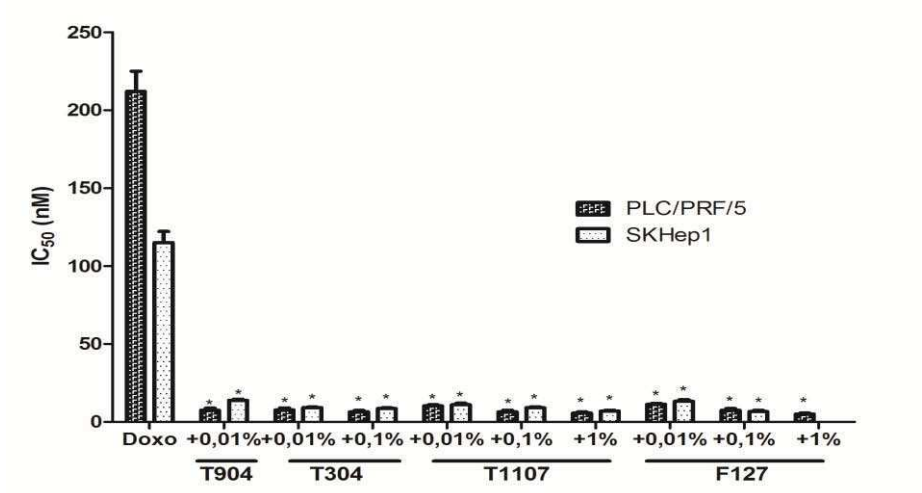


Figura 10: efecto de los co-polímeros sobre la citotoxicidad de la doxorrubicina en las células PLC/PRF/5 y SKHep1

El efecto de dichos co-polímeros se evaluó mediante el IRR. En todos los casos, este índice fue mayor cuanto mayor era la concentración de cada co-polímero. Las células PLC/PRF/5 resultaron ser entre 28 y 41 veces más sensibles a la doxorrubicina en presencia de los co-polímeros de PEO-PPO analizados. Por otra parte, las células SKHep1, también expuestas a los mismos co-polímeros, llegaron a ser entre 8 y 17 veces más sensibles a la doxorrubicina en presencia de cada uno de éstos.

Tabla 3: IC_{50} (nM) e IRR de doxorrubicina y doxorrubicina + co-polímero en las células PLC/PRF/5 y SKHep1.

Tratamiento		IC_{50} (nM)*		IRR	
		PLC/PRF/5	SKHep1	PLC/PRF/5	SKHep1
Doxo		212,03 ± 13,03	115,12 ± 7,02	NC	NC
Doxo + T904	0,01%	7,51 ± 1,37	13,86 ± 0,76	28	8
Doxo + T304	0,01%	7,72 ± 1,25	9,25 ± 0,32	27	12
	0,1%	6,50 ± 0,83	8,64 ± 0,45	33	13
Doxo + T1107	0,01%	10,34 ± 0,68	11,05 ± 0,92	32	10
	0,1%	6,55 ± 1,01	9,07 ± 0,66	32	13
	1%	5,72 ± 0,72	7,03 ± 0,43	37	16
Doxo + F127	0,01%	11,24 ± 0,69	13,30 ± 1,07	19	9
	0,1%	7,50 ± 1,14	6,64 ± 0,89	28	17
	1%	5,11 ± 0,56	NC	41	NC

*Los resultados muestran el promedio de 4 experimentos independientes ± SD.
NC: No corresponde.

I.3. Desarrollar estrategias tendientes a optimizar la terapéutica anti-HBV mediante el estudio de diferentes análogos de nucleósidos producidos por síntesis química en nuestro país y de co-polímeros de PEO-PPO en el contexto de un sistema in vitro de replicación del HBV

I.3.1. Estudio de la actividad antiviral de diferentes análogos de nucleósidos producidos por síntesis química

Primero se determinó la citotoxicidad de los análogos nucleosídicos mediante el ensayo de MTS. En los casos donde el análogo mostró citotoxicidad nula, se estudió la eficacia de estos antivirales a la concentración más alta. En el caso del compuesto 9-(1-hidroxi-Indan-2-il)-6-cloro-purina, se utilizó una concentración de 25 μM, mientras que para los 3 análogos restantes se utilizó la concentración más alta estudiada (100 μM), ya que los mismos no mostraron citotoxicidad alguna en todas las concentraciones ensayadas.

De los 4 análogos nucleosídicos estudiados, sólo el derivado de purina (9-(1-hidroxi-Indan-2-il)-6-cloro-purina) mostró tener actividad antiviral a los 6 días post-tratamiento, con una disminución de un 73% en los niveles del HBeAg respecto al control sin tratar (Figura 11 y Tabla 4). Por ello es que sólo se midió la carga viral para este compuesto, obteniéndose una disminución del 55% en la misma comparada con el control sin tratamiento (138353 UI/ml y 307139 UI/ml, respectivamente).

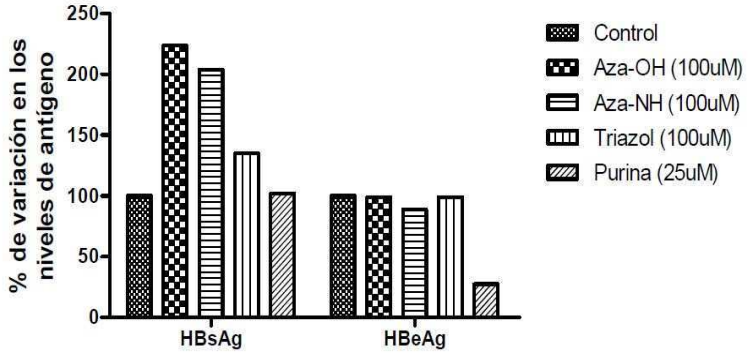


Figura 11: efecto de los análogos de nucleósidos sobre los niveles de HBsAg y HBeAg medidos en los sobrenadantes de células HepG2.2.15.
(Aza-OH: 9-(1hidroxi-Indan-2-il)-6-hidroxi-8-azapurina; Aza-NH: 9-(1hidroxi-Indan-2-il)-6-amino-8-azapurina; Triazol: 2-(5-hidroximetil-[1,2,3]triazol-1-il)-1-indanol y Purina: 9-(1hidroxi-Indan-2-il)-6-cloro-purina)

Tabla 4: determinación de HBsAg y HBeAg en células HepG2.2.15 tratadas con los diferentes análogos de nucleósidos producidos por síntesis química.

Tratamiento	HBsAg		HBeAg	
	Det. Cualit	Det. Semi Cuantit. (S/Co)	Det. Cualit	Det. Semi Cuantit. (S/Co)
Control	R	1,98	R	91,41
Azapurina-OH (100 μM)	R	4,43	R	90,39
Azapurina-NH (100 μM)	R	4,04	R	81,11
Triazol (100 μM)	R	2,67	R	90,59
Purina (25 μM)	R	2,02	R	**24,96**

R: reactivo; S/Co: "sobre el valor de *cut-off*"

I.3.2. Estudio de la actividad antiviral de co-polímeros de PEO-PPO

Se determinó la citotoxicidad de los co-polímeros en la línea celular HepG2.2.15 mediante el ensayo de MTS. En los casos en donde se observó citotoxicidad nula, se estudió el efecto de estos anfifilos a la concentración más alta.

Los co-polímeros T304, T1107 y F127, todos al 0,1%, mostraron una disminución (31%, 16% y 84%; respectivamente) en el HBeAg respecto al control, mientras que sólo el F127 disminuyó también el valor del HBsAg (82%). Estos co-polímeros también mostraron una disminución significativa en la carga viral, siendo el F127 el que provocó el mayor descenso de dicha carga (30%) (Figura 12 y Tabla 5).

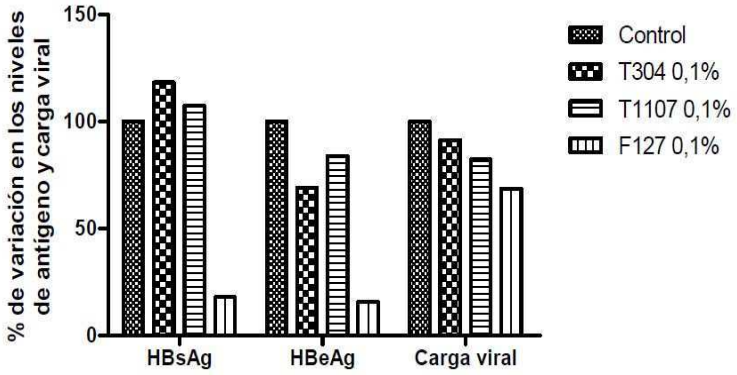


Figura 12: efecto de los diferentes co-polímeros sobre los niveles de HBsAg, HBeAg y carga viral, medidos en los sobrenadantes de células HepG2.2.15.

Tabla 5: determinación de HBsAg, HBeAg y cuantificación del ADN viral en células HepG2.2.15 tratadas con diferentes co-polímeros.

Tratamiento	HBsAg		HBeAg		Carga Viral (UI/ml)
	Det. Cualit.	Det. Semi Cuantit. (S/Co)	Det. Cualit.	Det. Semi Cuantit. (S/Co)	
Control	R	2,85	R	78,42	439227
T304 0,1%	R	3,37	R	**54,20**	400875
T1107 0,1%	R	3,06	R	**65,70**	361025
F127 0,1%	R	**0,51**	R	**12,27**	301088

R: reactivo; S/Co: "sobre el valor de *cut-off*"

II.

Estudio de los efectos farmacogenómicos y/o toxicogenómicos de materiales poliméricos empleados en la formulación de drogas antitumorales y antivirales

II.1. Estudiar el efecto de co-polímeros que se emplean en la formulación de drogas antitumorales y antivirales en la apoptosis e inmortalización celular

II.1.1. Ensayos de apoptosis

II.1.1.A. Determinación de la apoptosis por Anexina V-FITC/IP

Es bien conocido que a medida que progresa la apoptosis, la membrana plasmática se ve más comprometida y se vuelve permeable al IP permitiendo así diferenciar células en apoptosis temprana (AV^+/IP^-) y células en apoptosis tardía/necrosis (AV^+/IP^+). Las células viables son las que resultan AV^-/IP^- (Figura 13).

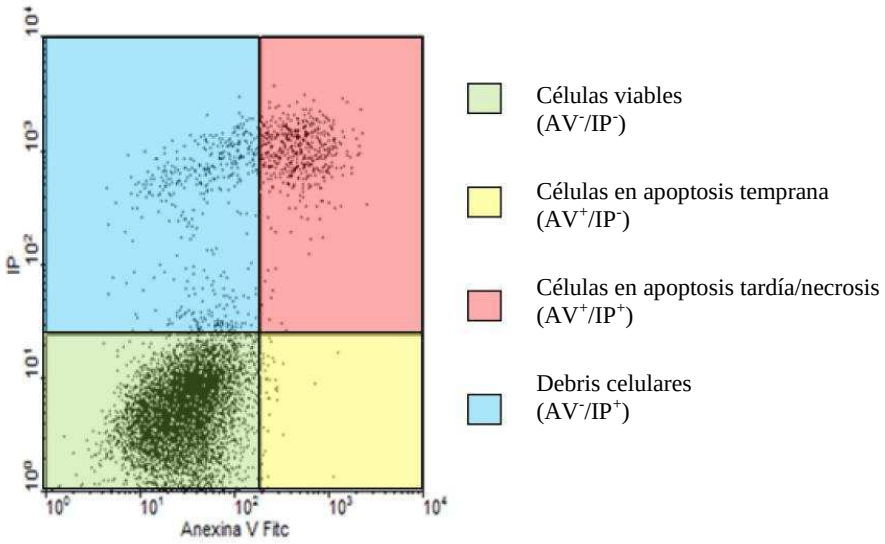


Figura 13: representación (*Dot Plot*) de un ensayo de marcación con Anexina V-FITC/IP mediante el programa *WinMDI 2.9*.

Se estudiaron los niveles de apoptosis temprana y tardía/necrosis inducida por los co-polímeros citocompatibles (determinados en el ensayo de MTS y la cuantificación de los niveles de transaminasas hepáticas). Dichos co-polímeros se ensayaron en ambas líneas celulares derivadas de HCC, usando la técnica de AV-FITC conjugada con IP. La cuantificación de los niveles de fluorescencia se detalla en las tablas 6 y 7.

En la siguiente figura se muestran, a modo de ejemplo, los gráficos de puntos obtenidos por citometría de flujo correspondientes a las líneas celulares PLC/PRF/5 (Figura 14A) y SKHep1 (Figura 14B) sin tratamiento, tratadas con un co-polímero citotóxico según el ensayo de MTS (T904 1%) y con un co-polímero citocompatible (T1107 1%).

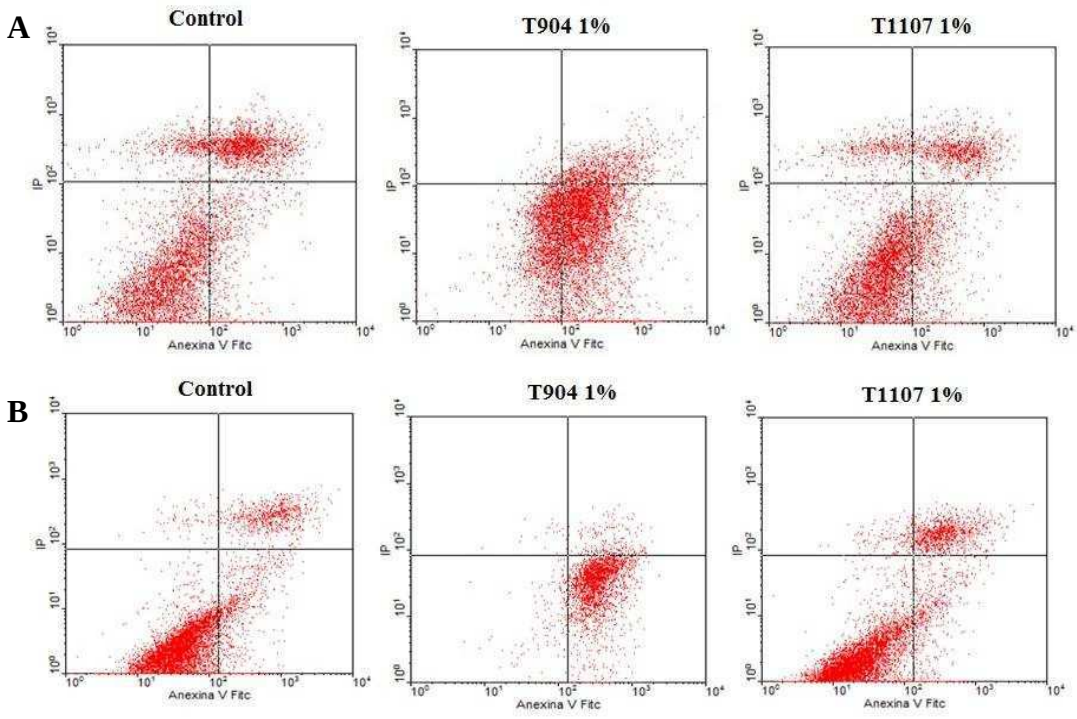


Figura 14: gráficos de puntos obtenidos mediante el programa *WinMDI 2.9* donde se muestran los niveles de fluorescencia en unidades arbitrarias (IP vs AnexinaV-FITC) en células A) PLC/PRF/5 y B) SKHep1 sin tratamiento (control), tratadas con T904 1% (co-polímero citotóxico por MTS) y con T1107 1% (co-polímero no citotóxico).

La exposición de PLC/PRF/5 durante 24 h a las concentraciones citocompatibles de T904, T304, T1107 y F127, no promovió un aumento significativo de la apoptosis temprana o tardía cuando se comparó con los controles. Sin embargo, a las 72 h, se detectó un aumento significativo en el número de células en apoptosis temprana (AV^+/IP^-) en aquellas células tratadas con T904 0,01%, T304 0,1%, T1107 0,01-1% y F127 0,01-1%. A ese mismo tiempo de incubación, se observó apoptosis tardía (AV^+/IP^+) sólo en las células tratadas con T1107 1% y F127 0,1% (Tabla 6).

Tabla 6: apoptosis temprana y tardía determinada por el ensayo de AV-FITC/IP a las 24 y 72 h luego de la exposición a los co-polímeros no citotóxicos por MTS en las células PLC/PRF/5 (* p < 0,05). Al control se le asignó arbitrariamente el valor 1.

PLC/PRF/5		24 h		72 h	
		Ap. temprana	Ap. tardía	Ap. temprana	Ap. tardía
Control		1,000	1,000	1,000	1,000
T904	0,01%	0,929 ± 0,581	1,030 ± 0,114	**1,280 ± 0,209***	1,054 ± 0,098
T304	0,01%	0,652 ± 0,258	1,125 ± 0,211	1,093 ± 0,145	0,830 ± 0,292
	0,1%	0,632 ± 0,225	0,980 ± 0,188	**1,460 ± 0,153***	0,834 ± 0,027*
T1107	0,01%	0,922 ± 0,072	0,798 ± 0,188	**1,888 ± 0,204***	1,122 ± 0,080
	0,1%	0,615 ± 0,023	1,069 ± 0,180	**1,745 ± 0,021***	0,934 ± 0,037
	1%	0,729 ± 0,139	1,067 ± 0,051	**1,849 ± 0,021***	**1,087 ± 0,045***
F127	0,01%	0,419 ± 0,266	0,697 ± 0,045	**1,889 ± 0,090***	0,836 ± 0,054*
	0,1%	0,257 ± 0,035	0,674 ± 0,045	**1,175 ± 0,065***	**1,132 ± 0,016***
	1%	0,389 ± 0,098	0,825 ± 0,088	**1,770 ± 0,148***	0,875 ± 0,013*

En el caso de las células SKHep1, el T1107 1% resultó ser el único co-polímero PEO-PPO capaz de inducir apoptosis temprana a las 24 h post-tratamiento, lo que se observó por un cambio significativo en el número de células AV^+/IP^- (Tabla 7).

Tabla 7: apoptosis temprana y tardía determinada por el ensayo de AV-FITC/IP a las 24 y 72 h luego de la exposición a los co-polímeros no citotóxicos por MTS en las células SKHep1 (* p < 0,05). Al control se le asignó arbitrariamente el valor 1.

SKHep1		24 h		72 h	
		Ap. temprana	Ap. tardía	Ap. temprana	Ap. tardía
Control		1,000	1,000	1,000	1,000
T904	0,01%	1,018 ± 0,168	1,260 ± 0,060	**1,286 ± 0,090***	**3,742 ± 0,191***
T304	0,01%	1,176 ± 0,327	1,222 ± 0,135	1,555 ± 0,385	**2,360 ± 0,209***
	0,1%	0,892 ± 0,085	1,162 ± 0,004	**2,504 ± 0,057***	**3,476 ± 0,421***
T1107	0,01%	0,717 ± 0,280	1,113 ± 0,183	**2,593 ± 0,140***	**2,983 ± 0,324***
	0,1%	0,891 ± 0,269	1,013 ± 0,142	**2,234 ± 0,292***	**2,125 ± 0,296***
	1%	**1,261 ± 0,034***	0,993± 0,007	**2,015 ± 0,049***	**3,217 ± 0,176***
F127	0,01%	0,590 ± 0,140	0,934 ± 0,169	1,100 ± 0,119	**2,517 ± 0,067***
	0,1%	0,628 ± 0,185	0,684 ± 0,082	**2,727 ± 0,303***	**3,401 ± 0,334***

Sin embargo, a las 72 h se observó un aumento significativo en el número de células en apoptosis temprana con los co-polímeros T904 0,01%, T304 0,1%, T1107 0,01%-1% y F127 0,1% y en apoptosis tardía/necrosis con todos los co-polímeros (Tabla 7).

II.1.1.B. Determinación de la hipodiploidía por IP

El análisis del contenido de ADN hipodiploide en las líneas celulares PLC/PRF/5 y SKHep1 se correlacionó adecuadamente con los resultados obtenidos con AV-FITC/IP. El número de células apoptóticas y/o necróticas, medida por la aparición de una población hipodiploide (Sub-G_0/G_1) aumentó significativamente en las células PLC/PRF/5 y SKHep1 a las 72 h, cuando se expusieron las células a los co-polímeros T904 0,01%; T304 0,1%; T1107 1%; F127 0,01% y F127 0,1%. Además, este efecto también pudo observarse para el F127 1% en PLC/PRF/5 y para el T1107 0,01 y 0,1% en las SKHep1 a las 72 h (Figura 15 y Tabla 8).

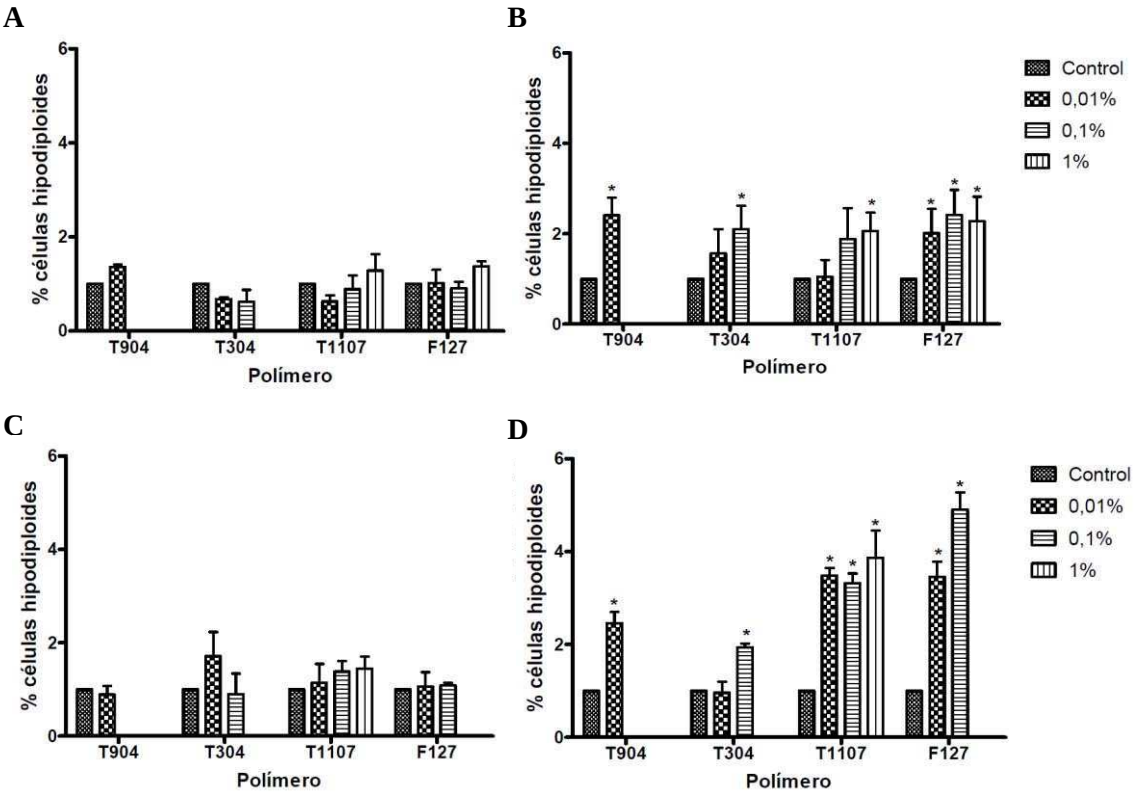


Figura 15: porcentaje de células hipodiploides documentadas luego de la incubación con los co-polímeros T904, T304, T1107 y F127. A: PLC/PRF/5 24 h; B: PLC/PRF/5 72 h, C: SKHep1 24 h y D: SKHep1 72 h (* $p < 0,05$). Al control se le asignó arbitrariamente el valor 1.

Tabla 8: porcentaje de células hipodiploides obtenidas luego de 24 y 72 h de tratamiento con los copolímeros en las líneas celulares PLC/PRF/5 y SKHep1 (* p<0,05).

		PLC/PRF/5		SKHep1	
		24 h	**72 h**	**24 h**	**72 h**
Control		1,000	1,000	1,000	1,000
T904	0,01%	1,361 ± 0,055	**2,407 ± 0,395***	0,890 ± 0,185	**2,457 ± 0,243***
T304	0,01%	0,678 ± 0,033	1,566 ± 0,533	1,812 ± 0,663	0,962 ± 0,240
	0,1%	0,618 ± 0,254	**2,100 ± 0,519***	0,901 ± 0,441	**1,943 ± 0,081***
T1107	0,01%	0,632 ± 0,125	1,046 ± 0,373	1,145 ± 0,402	**3,482 ± 0,167***
	0,1%	0,888 ± 0,289	1,885 ± 0,824	1,331 ± 0,154	**3,320 ± 0,214***
	1%	1,283 ± 0,346	**2,062 ± 0,549***	1,449 ± 0,112	**3,870 ± 0,588***
F127	0,01%	1,020 ± 0,284	**2,013 ± 0,537***	1,066 ± 0,303	**3,458 ± 0,325***
	0,1%	0,908 ± 0,136	**2,416 ± 0,555***	1,085 ± 0,055	**4,906 ± 0,372***
	1%	1,372 ± 0,106	**2,281 ± 0,539***	NC	NC

NC: No corresponde.

II.1.2. Determinación de los niveles de ARNm de *bax*, *bcl-2* y *h-tert* por RT-PCR *Multiplex*

Se estudió la expresión de los ARNm de los genes *bax*, *bcl-2*, *h-tert* y *β-actina*, este último como control, por RT-PCR *Multiplex* en las líneas celulares PLC/PRF/5 y SKHep1.

Se detectó expresión de todos los genes analizados en ambas líneas celulares, a excepción de *bcl-2* en la línea PLC/PRF/5 (Figura 16).

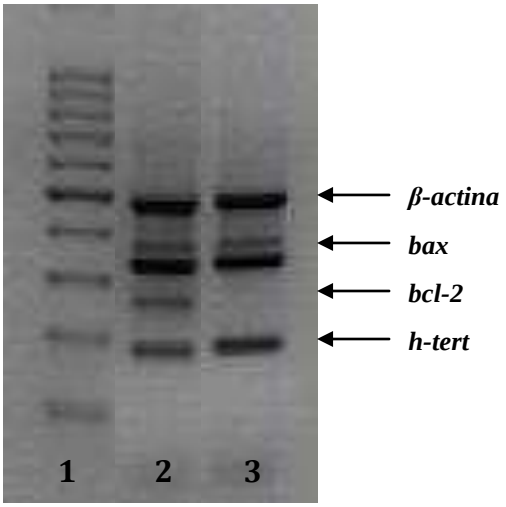


Figura 16: detección de los ARNm de *β-actina*, *bax*, *bcl-2* y *h-tert* por RT-PCR *Multiplex*. 1: Marcador de tamaño molecular, 2: SKHep1 y 3: PLC/PRF/5.

Luego se evaluó la expresión de estos genes en ambas líneas celulares, pero en presencia de los co-polímeros citocompatibles. En el caso de la línea celular PLC/PRF/5 se observó que a las 24 h todos los co-polímeros mostraron una disminución significativa en los niveles de ARNm de *bax*, que luego fue revertida a las 72 h, tiempo en el que se encontró un aumento significativo en todos los casos. Los niveles de ARNm de *h-tert* a las 24 h mostraron un aumento significativo con los co-polímeros T904 y T1107, mientras que con el F127 1% se observó una disminución significativa. En cambio, a las 72 h, excepto para las células tratadas con T304 0,01 y 0,1%, todos lo co-polímeros produjeron un aumento significativo en los niveles de expresión de *h-tert* (Figura 17 y Tabla 9).

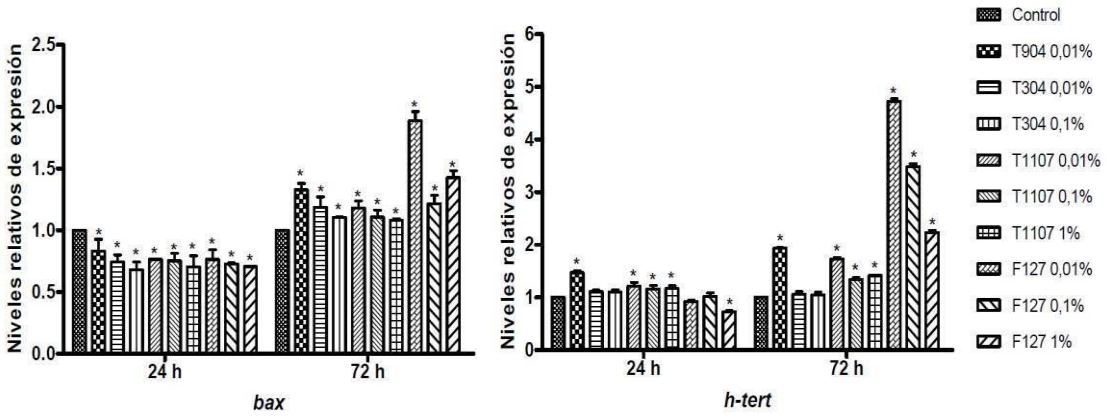


Figura 17: niveles de expresión relativa de los ARNm de *bax* y *h-tert* en la línea celular PLC/PRF/5 a las 24 y 72 h post-tratamiento con los co-polímeros no citotóxicos. Los niveles de expresión de estos genes se analizaron por RT-PCR *Multiplex* y se normalizaron con β-Actina. El valor del control se designó arbitrariamente como 1 (* $p < 0,05$).

Tabla 9: niveles de expresión de los ARNm de *bax* y *h-tert* en las células PLC/PRF/5 tratadas durante 24 y 72 h con los co-polímeros no citotóxicos. El valor del control se designó arbitrariamente como 1 (* $p < 0,05$).

PLC/PRF/5		*bax*		*h-tert*	
		24 h	**72 h**	**24 h**	**72 h**
Control		1,000	1,000	1,000	1,000
T904	0,01%	**0,831 ± 0,096***	**1,328 ± 0,052***	**1,473 ± 0,030***	**1,933 ± 0,011***
T304	0,01%	**0,741 ± 0,059***	**1,187 ± 0,083***	1,112 ± 0,026	1,057 ± 0,055
	0,1%	**0,679 ± 0,063***	**1,102 ± 0,006***	1,098 ± 0,044	1,048 ± 0,049
T1107	0,01%	**0,764 ± 0,001***	**1,181 ± 0,055***	**1,214 ± 0,073***	**1,732 ± 0,030***
	0,1%	**0,752 ± 0,061***	**1,107 ± 0,056***	**1,161 ± 0,066***	**1,339 ± 0,035***
	1%	**0,704 ± 0,090***	**1,077 ± 0,016***	**1,167 ± 0,054***	**1,414 ± 0,004***
F127	0,01%	**0,765 ± 0,076***	**1,885 ± 0,076***	0,927 ± 0,020	**4,724 ± 0,048***
	0,1%	**0,726 ± 0,008***	**1,215 ± 0,067***	1,016 ± 0,068	**3,483 ± 0,058***
	1%	**0,705 ± 0,004***	**1,427 ± 0,055***	**0,727 ± 0,020***	**2,234 ± 0,041***

Cuando se analizaron los niveles de expresión de *bax* en la línea SKHep1, se observó que el T1107 -al 0,1 y 1%- resultó ser el único co-polímero que aumentó significativamente los niveles de dicho ARNm a las 24 h de tratamiento. Por el contrario, a las 72 h se observó un aumento en los niveles de expresión de *bax* con todos los tratamientos, excepto en el caso del T304 0,01% que no modificó dicha expresión. No se observaron variaciones en la expresión del ARNm de *bcl-2* en ambos tiempos de exposición, excepto para el F127 0,1% que produjo un aumento significativo en la expresión de este gen a las 72 h post-exposición. En el caso de *h-tert* sólo el T304 0,1% produjo una disminución significativa a las 24 h en los niveles de mensajero, mientras que los demás co-polímeros no modificaron dicha expresión. Sin embargo a las 72 h se produjo un aumento significativo en la expresión de *h-tert* con todos los co-polímeros excepto T304 0,01% y T1107 0,01 y 0,1%. Cuando se analizó la relación *bcl-2/bax*, se observó que todos los co-polímeros ensayados -excepto el T304 0,01%- mostraron una disminución significativa en dicha relación comparado con el control luego de 72 h de tratamiento. A las 24 h post-exposición, sólo las células tratadas con T1107 0,1 y 1% mostraron una disminución en la relación *bcl-2/bax* (Figura 18 y Tabla 10).

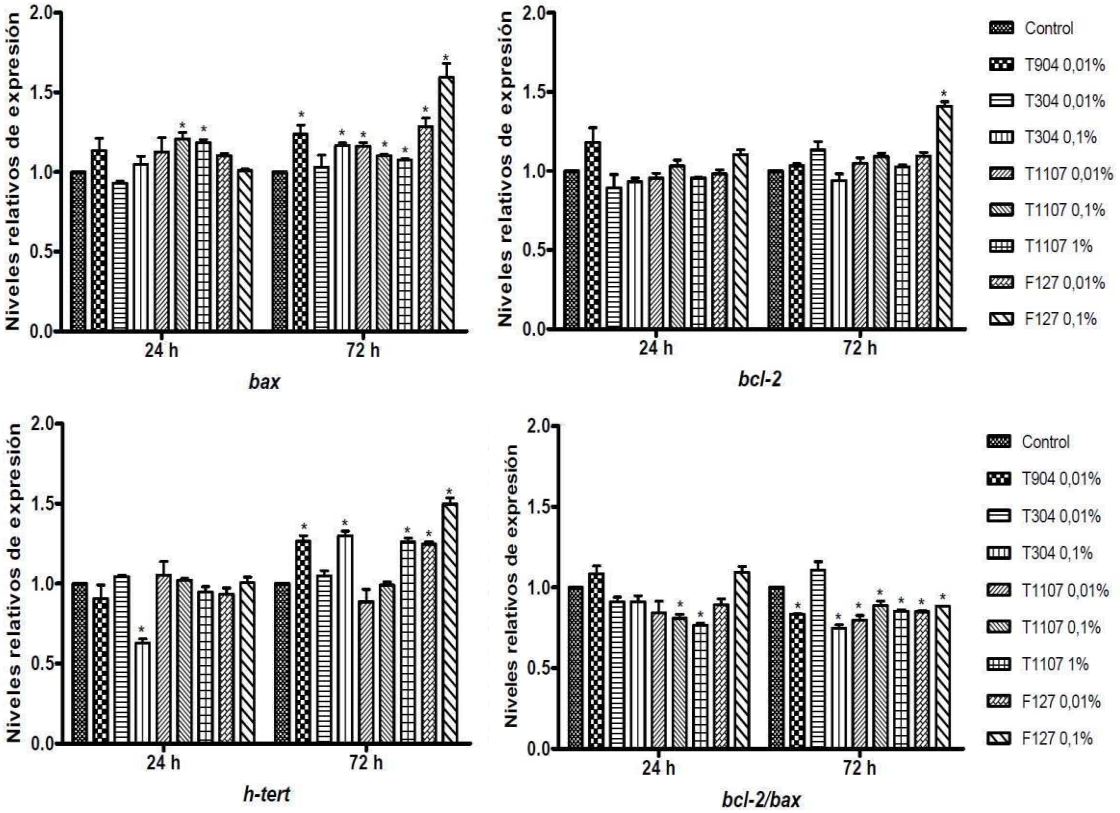


Figura 18: niveles de expresión relativa de los ARNm de *bax*, *bcl-2* y *h-tert* en la línea SKHep1 a las 24 y 72 h post-tratamiento con los co-polímeros no citotóxicos. Los niveles de expresión de estos genes se analizaron por RT-PCR *Multiplex y* se normalizaron con β-Actina. El valor del control se designó arbitrariamente como 1 (* $p < 0,05$).

Tabla 10: niveles de expresión de los ARNm de *bax*, *bcl-2*, *h-tert* y la relación *bcl-2/bax* en células SKHep1 tratadas durante 24 y 72 h con los co-polímeros no citotóxicos. El valor del control se designó arbitrariamente como 1 (* p < 0,05).

SKHep1		*bax*		*bcl-2*		*h-tert*		*bcl-2/bax*	
		24 h	**72 h**	**24 h**	**72 h**	**24 h**	**72 h**	**24 h**	**72 h**
Control		1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000
T904	0,01%	1,133 ± 0,079	**1,238 ± 0,057***	1,180 ± 0,094*	1,033 ± 0,013	0,904 ± 0,086	**1,265 ± 0,035***	1,081 ± 0,047	**0,835 ± 0,003***
T304	0,01%	0,929 ± 0,012	1,030 ± 0,078	0,893 ± 0,085	1,132 ± 0,053	1,043 ± 0,010	1,048 ± 0,033	0,908 ± 0,030	1,109 ± 0,051
	0,1%	1,048 ± 0,052	**1,166 ± 0,016***	0,932 ± 0,023	0,941 ± 0,041	**0,628 ± 0,028***	**1,299 ± 0,030***	0,912 ± 0,037	**0,746 ± 0,023**
T1107	0,01%	1,126 ± 0,089	**1,160 ± 0,025***	0,955 ± 0,031	1,049 ± 0,034	1,053 ± 0,026	0,886 ± 0,078	0,841 ± 0,074	**0,799 ± 0,027***
	0,1%	**1,208 ± 0,039***	**1,102 ± 0,008***	1,032 ± 0,037	1,092 ± 0,022	1,020 ± 0,011	0,990 ± 0,020	**0,809 ± 0,025***	**0,888 ± 0,027***
	1%	**1,183 ± 0,019***	**1,074 ± 0,009***	0,956 ± 0,004	1,026 ± 0,012	0,948 ± 0,034	**1,260 ± 0,025***	**0,766 ± 0,012***	**0,853 ± 0,010***
F127	0,01%	1,103 ± 0,013	**1,285 ± 0,051***	0,983 ± 0,026	1,094 ± 0,024	0,934 ± 0,039	**1,245 ± 0,016***	0,893 ± 0,039	**0,850 ± 0,008***
	0,1%	1,009 ± 0,009	**1,594 ± 0,086***	1,104 ± 0,030	**1,409 ± 0,029***	1,006 ± 0,035	**1,498 ± 0,038***	1,095 ± 0,035	**0,883 ± 0,002**

III.

Análisis del rol de la expresión de la proteína X del HBV en la regulación de la muerte celular programada, la proliferación y la inmortalización celular

III.1. Estudiar comparativamente los efectos de la expresión de la proteína X salvaje y mutada del HBV sobre los niveles de ARNm de bax, bcl-2 y h-tert

III.1.1. Expresión de la proteína X salvaje y mutada del HBV

Las células Huh7 fueron transfectadas con los plásmidos purificados pExp-X*sal* y pExp-X*mut* utilizando liposomas catiónicos. Al cabo de 24 y 72 h de realizada la transfección, las células fueron cosechadas determinándose la expresión de la proteína X -tanto salvaje como mutada- mediante WB.

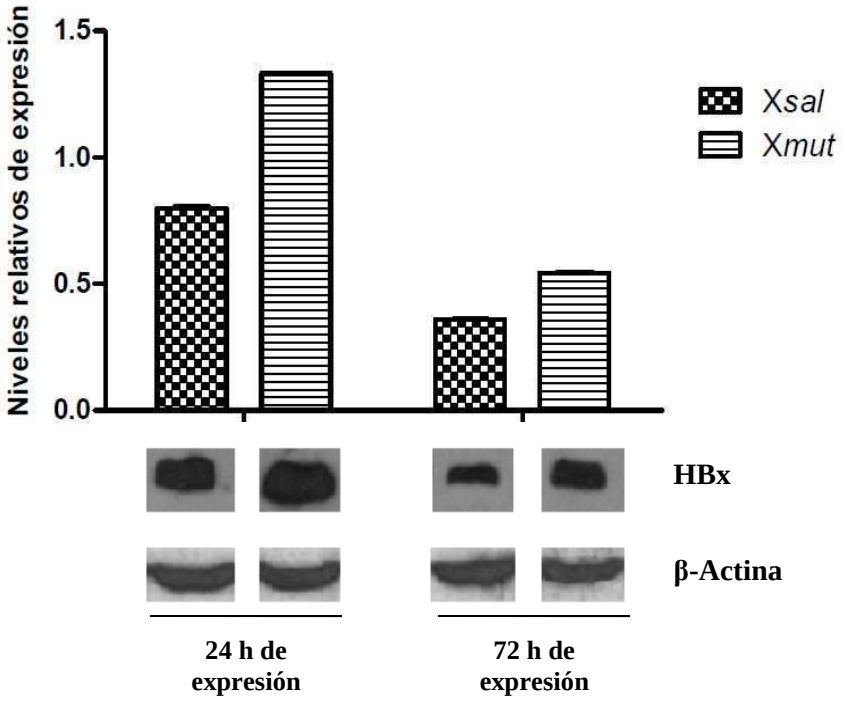


Figura 19: expresión de la proteína X del HBV (HBx) en células Huh7 transfectadas con los plásmidos pExp-X*sal* y pExp-X*mut*.

Como se observa en la figura 19, los niveles de expresión de ambas proteínas resultaron ser aproximadamente 2 veces mayor a las 24 h que a las 72 h.

Para establecer la eficiencia de la transfección, las células fueron transfectadas con vectores conteniendo el plásmido que codifica para la proteína verde fluorescente GFP (*Green Fluorescent Protein*), midiendo luego la fluorescencia por citometría de flujo. La eficiencia de transfección resultó ser del 35-40%.

III.1.2. Determinación de los niveles de ARNm de *bax, bcl-2* y *h-tert* por RT-PCR *Multiplex*

Los niveles de ARNm de *bax* no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los cultivos que expresaron transitoriamente las proteínas X*sal* y X*mut* respecto a los controles (tratamiento sólo con Lipofectamina) (Figura 20).

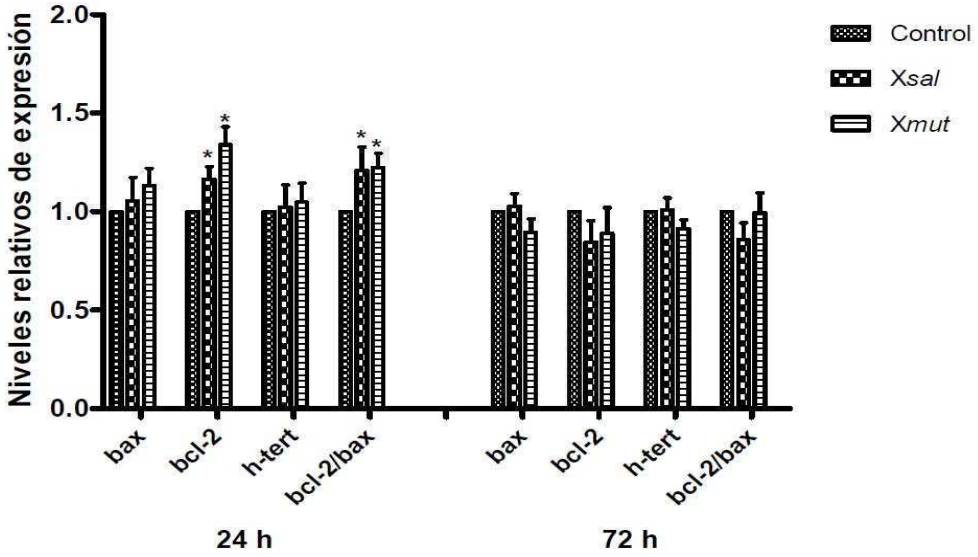


Figura 20: niveles de expresión relativa de los ARNm de *bax*, *bcl-2* y *h-tert* en células Huh7 que expresan X*sal* y X*mut* durante 24 y 72 h. Los niveles relativos de ARNm se normalizaron con *β-actina*. El valor de los controles se designó arbitrariamente como 1 (* $p < 0,05$).

Sin embargo, como se observa en la figura 20, el nivel de expresión del ARNm de *bcl-2* fue significativamente mayor en las células Huh7 que expresan altos niveles de HBx (1,163 ± 0,066 para X*sal* y 1,339 ± 0,091 para X*mut* a las 24 h) que en las células que expresan bajos niveles de dicha proteína viral (72 h post-transfección). A su vez, se observó que la relación *bcl-2/bax*, que determina la susceptibilidad de las células a la apoptosis, fue significativamente mayor a las 24 h (1,208 ± 0,119 para X*sal* y 1,222 ± 0,075 para la triple mutante X*mut*), mientras que a las 72 h disminuyó en células que expresan X*sal* (0,856 ± 0,087) y X*mut* (0,993 ± 0,101).

Los niveles de expresión del ARNm de *h-tert* no mostraron diferencias estadísticamente significativas en células Huh7 que expresan X*sal* o X*mut* tanto a las 24 como a las 72 h post-transfección (Figura 20).

III.2. Estudiar comparativamente los efectos de la expresión de la proteína X salvaje y mutada del HBV sobre los niveles de expresión de diversas proteínas involucradas en la regulación de la apoptosis, proliferación e inmortalización celular como c-Myc, caspasa 3 y 9, c-IAP1, c-IAP2, tanquirasa y ganquirina

c-Myc. El nivel de expresión de la proteína c-Myc resultó significativamente mayor en las células Huh7 que expresan X*sal* y X*mut* a las 24 h post-transfección (1,20 ± 0,01 y 1,30 ± 0,01; respectivamente). Sin embargo, a las 72 h c-Myc solo mostró un aumento estadísticamente significativo en las células que expresan X*sal* (1,40 ± 0,05) (Figura 21).

Caspasa 3. Se observó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de expresión de caspasa 3 en las células Huh7 transfectadas con X*sal* respecto al control a las 24 h post-transfección (0,74 ± 0,05) mientras que se documentó un aumento significativo en esta caspasa ejecutora en las células que expresan la triple mutante (1,28 ± 0,04). A las 72 h post-transfección se observó una disminución significativa en los niveles de expresión de esta caspasa, tanto para X*sal* como para X*mut* (0,86 ± 0,07 y 0,61 ± 0,09; respectivamente) (Figura 21).

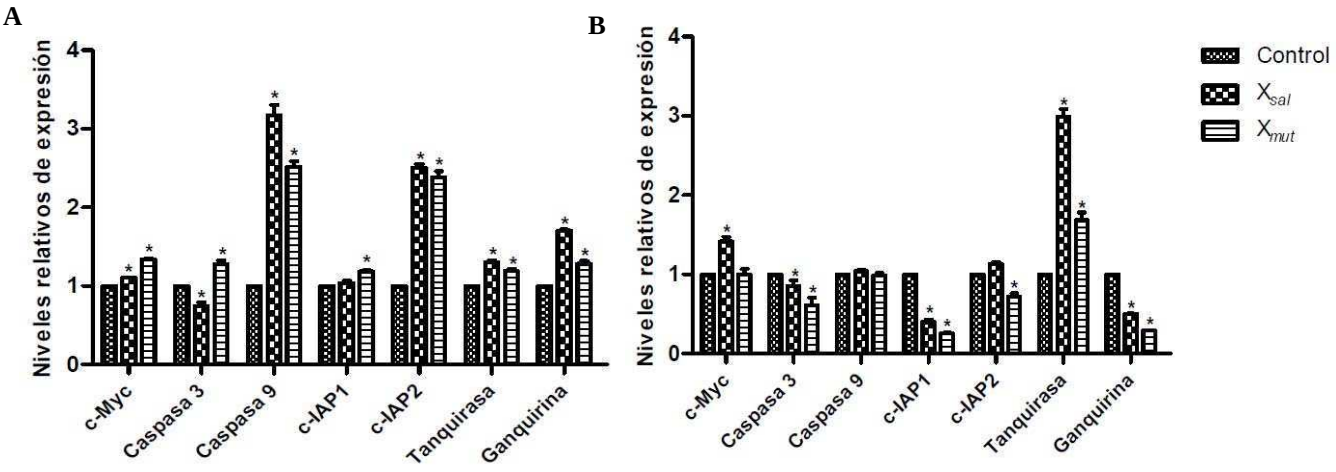


Figura 21: análisis de la expresión de las proteínas c-Myc, caspasa 3 y 9, c-IAP1, c-IAP2, tanquirasa y ganquirina por WB a las 24 h (A) y 72 h (B) post-transfección con pExp-X*sal* y pExp-X*mut*. Se sembraron cantidades equivalentes de proteína en cada caso. Los niveles relativos de proteína se normalizaron con β-Actina. El valor de los controles se designó arbitrariamente como 1 (* $p < 0,05$).

Caspasa 9. Los niveles de expresión de caspasa 9 fueron significativamente más elevados a las 24 h post-transfección en las células Huh7 que expresan X*sal* (3,17 ± 0,13) y X*mut* (2,52 ± 0,07) (Figura 21A). Por el contrario, a las 72 h no se observaron

diferencias estadísticamente significativas respecto al control en los cultivos que expresaban dichas proteínas virales.

c-IAP1. A las 24 h post-transfección se documentó un leve aumento en los niveles de c-IAP1 debido a la expresión de X*mut* (1,19 ± 0,02). Contrariamente, a las 72 h se observó una disminución significativa en los niveles de expresión de dicha proteína tanto en las células que expresaban X*sal* como en aquellas que expresaban X*mut* (0,40 ± 0,03 y 0,26 ± 0,01; respectivamente) (Figura 21).

c-IAP2. Se observó un aumento estadísticamente significativo en los niveles de expresión de dicha proteína en las células Huh7 transfectadas tanto con el vector de expresión pExp-X*sal* como con el vector pExp-X*mut* a las 24 h post-transfección (2,51 ± 0,05 y 2,38 ± 0,08; respectivamente). Por otra parte, las células Huh7 que expresan bajos niveles de X*mut* mostraron una disminución significativa 0,72 ± 0,04) en los niveles de dicha proteína celular (Figura 21).

Tanquirasa. A las 24 h post-transfección el nivel de expresión de esta proteína fue significativamente mayor tanto para aquellas células que expresaban X*sal* (1,30 ± 0,03) como para aquellas que expresaban la proteína viral mutada (1,2 ± 0,03). Más aún, luego de 72 h de expresión transitoria de ambas proteínas X, se registró un incremento aún mayor en los niveles de tanquirasa (3,00 ± 0,10 y 1,70 ± 0,10; respectivamente) (Figura 21).

Ganquirina. En las células Huh7 que expresan altos niveles de X*sal* y X*mut* se observó a las 24 h un aumento estadísticamente significativo en los niveles de esta proteína celular con respecto al control (1,71 ± 0,01 y 1,28 ± 0,04; respectivamente) (Figura 20A). En cambio, en células que expresan bajos niveles de X*sal* y X*mut* se observó una disminución estadísticamente significativa en los niveles de ganquirina (0,50 ± 0,01 y 0,29 ± 0,01; respectivamente) (Figura 21B).

III.3. Evaluar comparativamente los efectos observados con los datos adquiridos en un sistema de replicación in vitro para HBV

Los niveles de ARNm de *bax*, *bcl-2* y *h-tert* se evaluaron por medio de una RT-PCR *Multiplex* en un sistema de replicación *in vitro* para HBV (HepG2.2.15) y en células de estirpe hepatocitaria utilizadas como control (HepG2).

No se registraron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ARNm de *bax* en las células que mantienen la replicación de HBV con respecto a las células

control (1,210 ± 0,207). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en los niveles de ARNm de *h-tert* (1,276 ± 0,147) (Figura 22).

Por el contrario, en el sistema de replicación *in vitro* de HBV se documentó un aumento significativo en la expresión de *bcl-2* (3,078 ± 0,118) respecto al control y cuando se analizó la relación *bcl-2/bax*, se observó que ésta resultó significativamente más alta en las células HepG2.2.15 (2,538 ± 0,006) (Figura 22).

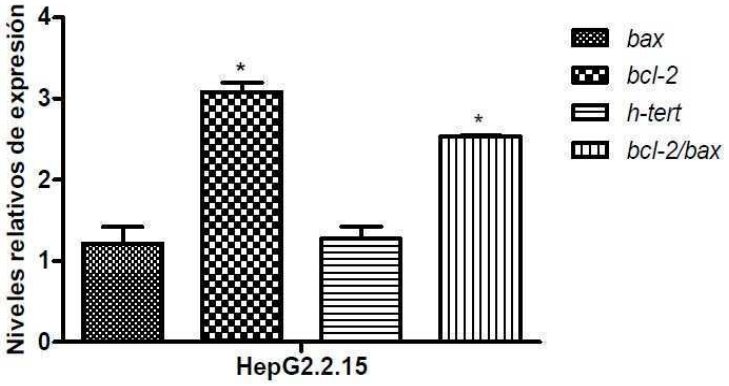


Figura 22: niveles relativos de los ARNm de *bax*, *bcl-2* y *h-tert* y relación *bcl-2/bax* en la línea celular HepG2.2.15. Los niveles de expresión del ARNm se normalizaron con *β-actina*. El valor del control (HepG2) se designó arbitrariamente como 1 (* $p < 0,05$).

Los niveles de expresión de las proteínas c-Myc, caspasa 3 y 9, c-IAP1, c-IAP2, tanquirasa y ganquirina se evaluaron en células del replicón de HBV mediante la técnica de WB con anticuerpos monoclonales específicos, en el cual los niveles relativos de proteína se normalizaron con β-Actina y el valor de los controles se designó arbitrariamente como 1 (Figura 23).

c-Myc. Los niveles de expresión de c-Myc resultaron significativamente mayores en las células HepG2.2.15 respecto al control (1,461 ± 0,052).

Caspasa 3. Se observó una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,05$) en las células que mantienen la replicación de HBV (0,681 ± 0,025) comparadas con su control.

Caspasa 9. Los niveles de esta proteína fueron significativamente más elevados (1,680 ± 0,108) en las células del replicón de HBV cuando se lo comparó con su control HepG2.

c-IAP1 y c-IAP2. En las células del replicón sólo el nivel de expresión de c-IAP1 resultó ser significativamente mayor respecto al control (1,684 ± 0,155), mientras que en c-IAP2 no se observaron variaciones estadísticamente significativas.

Tanquirasa. Las células HepG2.2.15 mostraron una disminución estadísticamente significativa (0,133 ± 0,087) en los niveles de esta proteína celular.

Ganquirina. Los niveles de expresión de esta oncoproteína resultaron significativamente mayores en la línea celular HepG2.2.15 (1,403 ± 0,081).

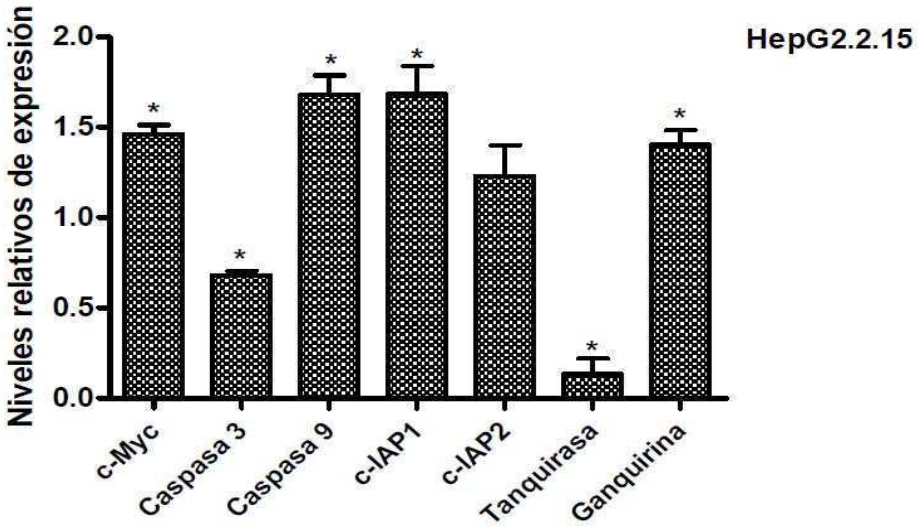


Figura 23: análisis de la expresión de las proteínas c-Myc, caspasa 3 y 9, c-IAP1, c-IAP2, tanquirasa y ganquirina por WB en células HepG2.2.15 y HepG2. Se sembraron cantidades equivalentes de proteína en cada caso. Los niveles relativos de proteína se normalizaron con β-Actina. El valor de los controles se designó arbitrariamente como 1 (* $p < 0,05$).

IV.

Aporte de nuevos conocimientos acerca de la patogénesis molecular de la infección por HBV analizando el rol de la expresión de la proteína X del virus sobre algunos miembros de la superfamilia ABC

IV.1. Estudiar comparativamente los efectos de la expresión de la proteína X salvaje y mutada del HBV sobre los niveles de expresión de MDR1, MRP1 y BCRP

IV.1.1. Análisis de los niveles de ARNm de *mdr1*, *mrp1* y *bcrp* por RT-qPCR

Se evaluó por RT-qPCR la variación en la expresión relativa de los genes *mdr1*, *mrp1* y *bcrp* en la línea celular Huh7 transfectada con los plásmidos purificados pExp-X*sal* y pExp-X*mut*.

No se documentaron variaciones estadísticamente significativas en los niveles relativos del ARNm de *mdr1* en los dos tiempos ensayados, tanto en las células Huh7 que expresaban la proteína X*sal* como la X*mut.* Sólo se evidenció un aumento estadísticamente significativo en la expresión del gen *mrp1* debido a la expresión de la proteína X*mut* a las 24 h post-transfección. A las 24 h se observó un aumento significativo en la expresión de *bcrp* en las células que expresaban X*sal*, mientras que en aquellos cultivos que expresaban la proteína X*mut*, luego de 72 h post-transfección se evidenciaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en la expresión de dicho gen celular (Tabla 11).

Tabla 11: niveles de expresión relativa de los genes *mdr1*, *mrp1* y *bcrp* por RT-qPCR en células Huh7 transfectadas con pExp-X*sal* y pExp-X*mut* luego de 24 y 72 h de expresión transitoria. El nivel de expresión de los ARNm en el control (células Huh7 tratadas con Lipofectamina) se designó arbitrariamente como 1 (* p < 0,05).

Muestra	*mdr1*		*mrp1*		*bcrp*	
	24 h	72 h	24 h	72 h	24 h	72 h
Control	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
X*sal*	1,19 ± 0,46	1,36 ± 0,33	1,14 ± 0,21	1,28 ± 0,26	**1,56 ± 0,25***	1,36 ± 0,27
X*mut*	1,58 ± 0,48	1,03 ± 0,09	**1,75 ± 0,13***	0,97 ± 0,17	1,36 ± 0,42	**1,42 ± 0,04***

IV.1.2. Estudio de los niveles de expresión de proteínas MDR1, MRP1 y BCRP por WB

La detección de la expresión de las proteínas MDR1, MRP1 y BCRP se realizó mediante la técnica de WB con anticuerpos monoclonales específicos en la línea celular Huh7 con expresión transitoria de las proteínas X*sal* o X*mut*.

El análisis de la expresión de MDR1, no mostró una variación estadísticamente significativa en las células que expresaban HBx salvaje o mutada respecto al control en ambos tiempos post-transfección (Figura 24 y Tabla 12).

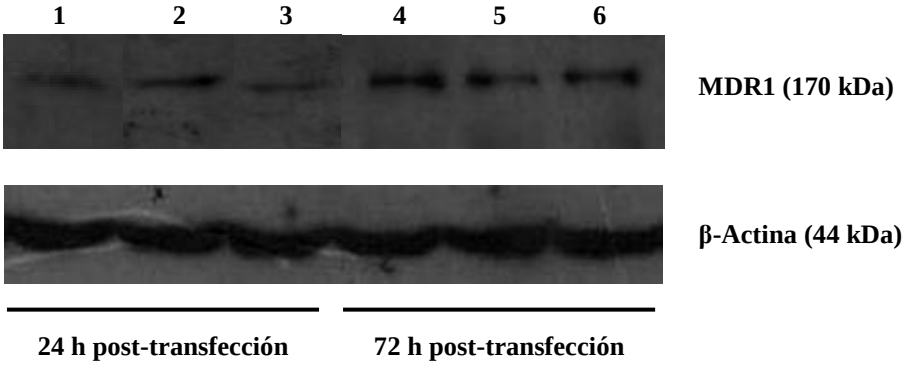


Figura 24: análisis de los niveles de expresión de MDR1 en células Huh7 que expresaron transitoriamente las proteínas X*sal* (2 y 5) o X*mut* (3 y 6) durante 24 y 72 h. Control: células tratadas con Lipofectamina (1 y 4). Se sembraron cantidades equivalentes de proteína en cada caso. Los niveles relativos de proteína se normalizaron con β-Actina (* $p < 0,05$).

Tabla 12: niveles de expresión relativa de la proteína MDR1 en células Huh7 que expresaron transitoriamente las proteínas X*sal* o X*mut* durante 24 y 72 h. Control: células tratadas con Lipofectamina. El nivel de expresión de la proteína en el control se designó arbitrariamente como 1 (* $p < 0,05$).

Tratamiento	MDR1	
	24 h	72 h
Control	1,000	1,000
X*sal*	1,104 ± 0,012	0,828 ± 0,149
X*mut*	1,030 ± 0,023	0,839 ± 0,096

Al analizar la expresión de la proteína MRP1, no se observaron diferencias estadísticamente significativas en su expresión en células que expresaban X*sal*, mientras que se observó un incremento significativo en aquellas células que expresaban la proteína X*mut* del HBV a las 24 h. A las 72 h no se observó variación alguna en la expresión de MRP1 en las células que expresaban tanto X*sal* como X*mut* (Figura 25 y Tabla 13).

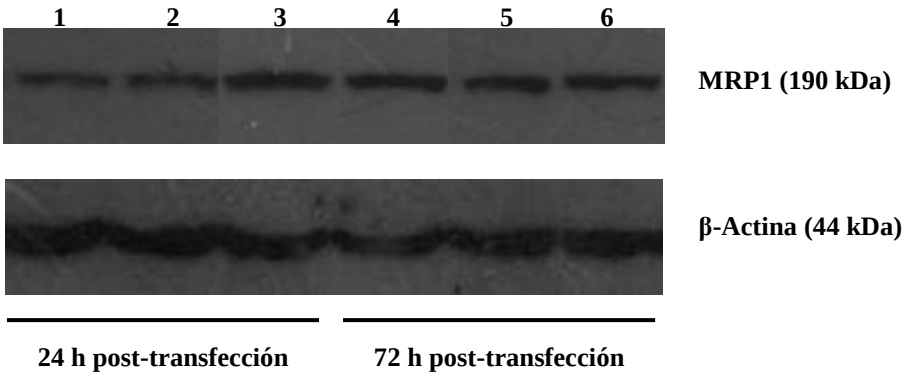


Figura 25: análisis de los niveles de expresión de MRP1 en células Huh7 que expresaron transitoriamente las proteínas X*sal* (2 y 5) o X*mut* (3 y 6) durante 24 y 72 h. Control: células tratadas con Lipofectamina (1 y 4). Se sembraron cantidades equivalentes de proteína en cada caso. Los niveles relativos de proteína se normalizaron con β-Actina (* $p < 0,05$).

Tabla 13: niveles de expresión relativa de la proteína MRP1 en células Huh7 que expresaron transitoriamente las proteínas X*sal* o X*mut* durante 24 y 72 h. Control: células tratadas con Lipofectamina. El nivel de expresión de la proteína en el control se designó arbitrariamente como 1 (* $p < 0,05$).

Tratamiento	MRP1	
	24 h	72 h
Control	1,000	1,000
X*sal*	0,992 ± 0,042	0,930 ± 0,137
X*mut*	**1,441 ± 0,023***	0,932 ± 0,088

En el caso de BCRP, se evidenció un aumento significativo en los niveles de expresión en las células Huh7 que expresaban la proteína X*sal* a las 24 h, mientras que a las 72 h hubo un aumento significativo tanto para X*sal* como para X*mut* respecto al control (Figura 26 y Tabla 14).

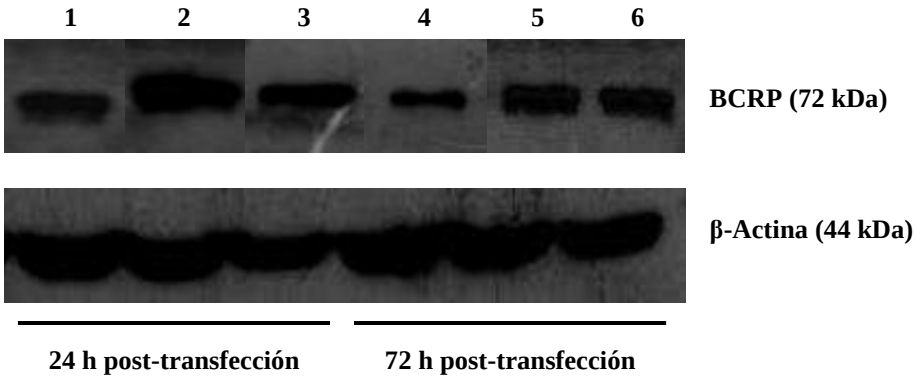


Figura 26: análisis de los niveles de expresión de BCRP en células Huh7 que expresaron transitoriamente las proteínas X*sal* (2 y 5) o X*mut* (3 y 6) durante 24 y 72 h. Control: células tratadas con Lipofectamina (1 y 4). Se sembraron cantidades equivalentes de proteína en cada caso. Los niveles relativos de proteína se normalizaron con β-Actina (* $p < 0,05$).

Tabla 14: niveles de expresión relativa de la proteína BCRP en células Huh7 que expresaron transitoriamente las proteínas X*sal* o X*mut* durante 24 y 72 h. Control: células tratadas con Lipofectamina. El nivel de expresión de la proteína en el control se designó arbitrariamente como 1 (* p < 0,05).

Tratamiento	BCRP	
	24 h	72 h
Control	1,000	1,000
X*sal*	**2,322 ± 0,101***	**2,927 ± 0,134***
X*mut*	0,944 ± 0,060	**2,735 ± 0,123***

IV.2. Evaluar comparativamente los efectos observados con los datos adquiridos en un sistema de replicación in vitro para HBV

Cuando se analizaron los niveles de expresión del ARNm de *mdr1*, se observó un aumento significativo en las células del replicón respecto al control. Lo mismo ocurrió con los niveles de expresión del gen *mrp1*. Sin embargo, en el caso de *bcrp*, se observó una disminución significativa en los niveles de ARNm de este gen (Tabla 15).

Tabla 15: niveles de expresión relativa de los genes *mdr1*, *mrp1* y *bcrp* por RT-qPCR en células HepG2.2.15. El nivel de expresión de estos genes en el control (HepG2) se designó arbitrariamente como 1 (* p < 0,05).

Línea celular / Gen	*mdr1*	*mrp1*	*bcrp*
HepG2	1,0000	1,0000	1,0000
HepG2.2.15	**2,2600 ± 0,0200***	**2,2400 ± 0,8100***	**0,0023 ± 0,0015***

Cuando se analizaron los niveles de expresión de estas proteínas ABC (Figura 27 y Tabla 16), se observó que tanto la expresión de MDR1 como de MRP1 aumentó significativamente respecto al control, mientras que la expresión de BCRP mostró una disminución significativa. Estos resultados coinciden con los obtenidos por RT-qPCR.

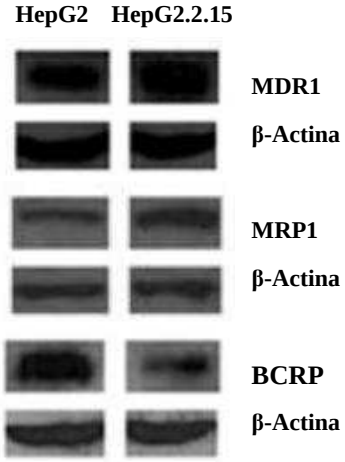


Figura 27: análisis de los niveles de expresión de MDR1, MRP1 y BCRP en células HepG2.2.15 evaluadas por WB. Se sembraron cantidades equivalentes de proteína en cada caso. Los niveles relativos de proteína se normalizaron con β-Actina.

Tabla 16: niveles de expresión de las proteínas MDR1, MRP1 y BCRP en la línea celular HepG2.2.15. El nivel de expresión de estas proteína en el control (HepG2) se designó arbitrariamente como 1 (* p < 0,05).

Células/ Proteína	MDR1	MRP1	BCRP
HepG2	1,000	1,000	1,000
HepG2.2.15	**1,308 ± 0,151***	**1,551 ± 0,099***	**0,178 ± 0,002***

DISCUSIÓN

DISCUSIÓN

Uno de los objetivos centrales de la presente tesis doctoral fue contribuir a la búsqueda de soluciones más eficaces para el tratamiento de diferentes enfermedades hepáticas como la hepatitis crónica causada por el HBV y el HCC. Éstas constituyen enfermedades de alto impacto social cuya farmacoterapia puede ser abordada y mejorada de manera notable utilizando diversas estrategias terapéuticas como la inhibición de las bombas de transporte pertenecientes a la superfamilia de transportadores ABC. Otro de los objetivos de este trabajo fue aportar nuevos conocimientos sobre la patogénesis molecular de la infección por HBV y el desarrollo del HCC. Todos estos son temas centrales de investigación de nuestro grupo en el Laboratorio de Hepatitis Virales del Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica (IMPaM, UBA-CONICET).

A continuación se discutirán los resultados obtenidos en la presente tesis doctoral.

Desarrollar estrategias tecnológicas tendientes a optimizar la terapéutica anti-HCC y anti-HBV.

El HCC es considerado un tumor molecularmente complejo, que se caracteriza por una elevada resistencia intrínseca a múltiples drogas, incluyendo a los agentes antitumorales (Herr et al., 2007). La capacidad de las células tumorales de adquirir resistencia a dichos fármacos está frecuentemente mediada por la sobre-expresión de proteínas de la superfamilia ABC (Gottesman et al., 2002). Con respecto a ello, numerosos autores han observado un aumento significativo en la expresión de estas proteínas, principalmente de MDR1, MRP1, MRP2 y BCRP en el HCC (Bonin et al., 2002; Sukowati et al., 2012), lo cual explicaría el alto nivel de resistencia de este tumor a los diferentes fármacos citostáticos empleados en la terapéutica. La sobre-expresión de varios miembros pertenecientes a esta familia de transportadores es también uno de los mecanismos que conducen al fenotipo MDR (*Multidrug Resistance* o Resistencia a múltiples drogas) en los pacientes infectados con el HBV y tratados con los antivirales actualmente en uso. En la actualidad se llevan a cabo numerosos estudios a fin de lograr superar la MDR en ambos escenarios, el HCC y el paciente crónicamente infectado con HBV.

BCRP es uno de los miembros de la subfamilia ABCG y la sobre-expresión del mismo está asociada a la resistencia a múltiples fármacos, como el antitumoral doxorrubicina y los análogos de nucleósidos utilizados en el tratamiento de pacientes HIV$^{(+)}$ como son el abacavir y la zidovudina (Pan et al., 2007). Recientemente, se ha reportado que otros análogos nucleos(t)ídicos -como efavirenz, abacavir, tenofovir- también son sustratos de esta bomba (Peroni et al., 2011; Janeeh et al., 2011; Neumanova et al., 2014). Se ha podido determinar que esta proteína cumplen un rol fundamental en la biodisponibilidad y el acceso de dichas drogas a sitios santuarios de la infección (Pan et al., 2007) y su sobre-expresión está asociada a resistencia a la terapéutica antiviral.

Una de las estrategias que se está evaluando actualmente para mejorar la eficacia de la farmacoterapia anticancerosa y antiviral -además de disminuir los efectos adversos provocados por los fármacos en uso y de mejorar la biodisponibilidad de los mismos- es la formulación de fármacos donde el compuesto activo esté acompañado de co-polímeros segmentados de PEO y PPO (poloxaminas o Tetronic® y poloxámeros o Pluronic®), ya sea en forma de unímeros o como micelas poliméricas. De acuerdo a la literatura internacional, estos polímeros en forma de unímeros actúan inhibiendo la actividad de las bombas ABC o bien disminuyendo su expresión, promoviendo así la concentración intracelular adecuada de droga para que ésta sea eficaz (Kabanov et al., 2002; Alakhova et al., 2010; Cuestas et al., 2011). Con respecto a ello, Sharma y col. reportaron la capacidad del Pluronic® P85 de inhibir la proteína ABC MDR1 -también denominada glicoproteína P o Pgp- en células leucémicas (Sharma et al., 2008).

En la presente tesis se estudió el efecto de diferentes co-polímeros de PEO-PPO (T904, T304, T1107 y F127) a diferentes concentraciones (0,01%-1%) sobre los niveles de expresión de BCRP en dos líneas celulares de hepatoma humano (PLC/PRF/5 y SKHep1), como un primer paso en la búsqueda de estrategias farmacotécnicas orientadas a revertir el fenotipo MDR. Posteriormente se evaluó la capacidad de los mismos de mejorar la sensibilidad de dichas células al antitumoral doxorrubicina.

En ambas líneas celulares la mayoría de los co-polímeros ensayados produjo una reducción en la expresión de BCRP. Dichos efectos fueron dependientes de la línea celular estudiada, el tiempo de exposición y la concentración de cada co-polímero. A diferencia de lo reportado por numerosos autores -donde se describe la inhibición de las bombas sólo por los polímeros en forma de unímeros- los resultados presentados en esta tesis doctoral indican que **estos co-polímeros inhibirían BCRP tanto en forma de unímero como de micela**. Más aún, nuestro grupo de investigación corroboró en

trabajos anteriores la capacidad inhibitoria de dichos compuestos sobre la actividad funcional de las bombas ABC, MDR1, MRP1 y BCRP empleando DiOC2, rodamina 123 y vinblastina (Cuestas et al., 2011; Cuestas et al., 2012). En concordancia con esto, en este trabajo de tesis se documentó un aumento en el $\Delta\Psi_m$ luego de la exposición de las células a los mismos co-polímeros. Esto indicaría que muy probablemente la inhibición de la actividad funcional de BCRP por parte de dichos surfactantes sea a través de la afectación de la cadena respiratoria -por efecto de la desestabilización de la membrana mitocondrial- con la consiguiente disminución en la síntesis del ATP necesario para que las bombas ABC sean activas. Más importante aún es que **la sensibilidad a doxorrubicina se incrementó entre 8 a 41 veces en presencia de las poloxaminas y poloxámeros estudiados, en comparación con las células tratadas solamente con doxorrubicina. Ello implicaría que los co-polímeros estudiados contribuyen a la quimiosensibilización de líneas celulares de estirpe hepatocitaria provenientes de hepatoma humano, ya sea mediante la disminución en la expresión de BCRP, por una disminución en la actividad funcional de dicha bomba y/o por alteración en la estructura de la membrana plasmática por su acción surfactante (Alakhova et al., 2010).** Asimismo, todos los co-polímeros estudiados en la presente tesis presentaron a su vez efectos pro-apoptóticos sugiriendo un posible rol sinérgico con dicho antitumoral. Estos hallazgos demuestran la potencial utilidad de estos compuestos poliméricos como agentes de reversión a la resistencia, aumentando de esta manera la eficacia de la quimioterapia contra el cáncer.

Este trabajo fue honrado con el otorgamiento del 1er. Premio 2013 "Dr. José Francisco Zelasco" "A la excelencia en Investigación Básica en Hepatología" por la Asociación Argentina para el Estudio de las Enfermedades del Hígado (AAEEH).

El HBV ha sido reconocido como uno de los principales agentes etiológicos de la hepatitis viral humana, la cirrosis y el HCC. Desafortunadamente, hasta el presente, no se dispone de un fármaco antiviral para el tratamiento eficaz de la hepatitis B crónica que logre erradicar totalmente al HBV del organismo hospedador. La monoterapia con IFN-α convencional no es efectiva y está limitada por la gran cantidad de efectos adversos que presenta en forma dosis-dependiente (Negro, 2010). El tratamiento mono-droga con análogos de nucleósidos (lamivudina) o nucleótidos (adefovir) tampoco resulta del todo satisfactoria (Melegari et al., 1998; Stein y Loomba, 2009), ya que el

tratamiento a corto plazo con estos análogos no es suficiente para erradicar la infección viral, y a largo plazo aparecen variantes resistentes a los mismos (Ghany y Liang, 2007; Palumbo, 2008), con el consiguiente empeoramiento de la enfermedad hepática. Actualmente, están disponibles en el mercado nuevas drogas como los inmunomoduladores PEG-IFN-α y timosina α-1, los análogos de nucleósido entecavir y telbivudina, y el análogo de nucleótido tenofovir, que si bien muestran ser más eficaces que los antivirales mencionados anteriormente, todavía demandan la optimización de los regímenes de administración (Balsano y Alisi, 2008; Reijnders y Janssen, 2008; Yang et al., 2008; Lampertico, 2009). Entre los factores que dificultan la eliminación del virus, merecen señalarse dos: (i) la presencia nuclear de cadenas de ADNccc del HBV, que actúa como templado para la síntesis de los distintos ARNm virales y del ARN pre-genómico (que es el intermediario de replicación del virus); ningún antiviral utilizado actualmente logra erradicar al ADNccc, lo que contribuye al rebote de la actividad viral tras el cese del tratamiento farmacológico (Angus et al., 2003) y, (ii) en etapas tardías, la transcripción del ADN viral integrado al genoma celular (Murakami et al., 2005).

Además de un problema médico, la hepatitis crónica por HBV es un problema económico: el impacto en la economía es enorme y la tendencia actual en los países centrales es invertir recursos en investigación, prevención y tratamiento precoz de la enfermedad, ya que el tratamiento de estadios avanzados resulta, a nivel poblacional, una carga económica excesiva y potencialmente inabordable aún por los países con mayores recursos.

Por ello resulta de suma importancia ensayar nuevas drogas que puedan aumentar el arsenal terapéutico empleado en la cura de la hepatitis B. En tal sentido, empleando indeno como material de partida, el grupo de Investigación dirigido por la Prof. Dra. Moglioni, de la Cátedra de Química Medicinal de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, ha sintetizado y ensayado distintos carbonucleósidos racémicos. En la evaluación de los mismos como potenciales agentes activos frente al HBV, sólo el compuesto derivado de purina resultó activo, con una disminución de un 73% en los niveles del HBeAg respecto al control sin tratar y una disminución del 55% de la carga viral comparada con dicho control. Sin embargo, no debe descartarse que los otros compuestos -como enantiómeros puros- tengan actividad frente a este virus hepatotrópico.

Cabe destacar que determinando la relación existente entre la estructura química, las

propiedades físicoquímicas, la reactividad y la respuesta biológica -en este caso la actividad anti-HBV- se proporcionaron los conocimientos necesarios para la creación de nuevos fármacos anti-HBV que se pueden obtener mediante fármaco-modulación del derivado purínico del análogo de carbonucleósido ensayado (Dra. Moglioni, comunicación personal, Cátedra de Química Medicinal de la Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA). Estos compuestos son candidatos para los futuros ensayos con formulaciones co-polímero/droga antiviral en modelos de replicación *in vitro* del HBV. En este sentido también, se espera realizar futuras investigaciones con formulaciones co-polímero/droga antiviral en modelos de replicación *in vitro* de HBV con el objeto de estudiar si el efecto sobre la expresión y actividad de BCRP se traduce en una mejoría en la eficacia de la farmacoterapia antiviral. Como primera instancia se comenzó con el ensayó de actividad antiviral de los poloxámeros y poloxaminas a ser utilizadas en las futuras formulaciones. **Algunos de estos co-polímeros demostraron presentar actividad antiviral, la cual se evidenció por una disminución significativa de los niveles de HBeAg y la carga viral de HBV**.

Cuando se analizó la relación estructura-actividad de los distintos co-polímeros ensayados, se observó que los que produjeron una mayor inhibición sobre la replicación del HBV fueron aquellos que presentaron valores de BHL altos. De acuerdo con esto, el T1107 -uno de los co-polímeros más hidrofílicos de todos los ensayados (BHL: 18-23) y el que presentó el mayor PM (15,0 kDa)- fue la poloxamina con mayor actividad antiviral. Sin embargo el poloxámero F127 -igual de hidrofílico que el T1107 (BHL: 18-23)- logró inhibir al HBV en mayor medida. Dicha diferencia entre ambos co-polímeros de igual hidrofilicidad puede deberse a que el F127 es una molécula más pequeña (PM 12,6 kDa) que el T1107.

Además, se debe tener en cuenta que estos anfifilos presentan propiedades tensioactivas, incluyendo la capacidad de interactuar con membranas biológicas, lo que podría afectar los mecanismos de salida o de ingreso del virus a la célula hospedadora. En el primer caso sería por desestabilización de las membranas del retículo endoplásmico, donde el virus adquiere la envoltura o donde el virus se ensambla para generar el virión. En el otro caso, un posible mecanismo podría ser por la interacción con la envoltura viral afectando las glicoproteínas virales (anti-receptores) las cuales permiten el ingreso del virus a la célula hospedadora al interaccionar con las moléculas receptoras (y/o co-receptoras) presentes en la superficie celular. En este último caso, se debería analizar la entrada del HBV utilizando células susceptibles a la infección, tales como hepatocitos

primarios humanos y células HepaRG. **Este resultado sienta nuevos precedentes ya que -hasta la realización de esta tesis de doctorado- no se contaba con estudios que probaran la actividad antiviral de los co-polímeros aquí estudiados, lo que permite demostrar la versatilidad de estos surfactantes como potenciales adyuvantes en la terapia del HBV y HCC.**

Si bien los resultados obtenidos al ensayar los co-polímeros son alentadores -en cuanto a la capacidad de los mismos de quimiosensibilizar células MDR o por su capacidad antiviral- surge la pregunta: ¿es correcto considerar a dichos co-polímeros de PEO-PPO como excipientes biológicamente inertes o GRAS? Este paradigma está siendo reconsiderado por la genómica polimérica, que estudia de qué manera las moléculas poliméricas y nanomateriales empleados en la formulación de drogas pueden afectar la respuesta celular o del organismo hacia ella.

Dado la creciente evidencia que se ha ido acumulando en la última década que sugiere que dichos compuestos poliméricos tendrían diversos efectos sobre las células del organismo, en la presente tesis se quiso profundizar en la capacidad de los mismos de afectar otros genes celulares, sobre todo aquellos implicados en la apoptosis, proliferación e inmortalización celular. Con respecto a esto, **todos los co-polímeros ensayados evidenciaron un incremento estadísticamente significativo en los niveles de ARNm de *bax* y de *h-tert*.** Además, como se mencionó anteriormente, dichos surfactantes indujeron apoptosis en ambas líneas celulares. Estos estudios sugieren la necesidad de evaluar exhaustivamente los efectos farmacogenómicos de los co-polímeros en la formulación de medicamentos, sobre todo no citostáticos, para optimizar los resultados clínicos y comprender los efectos farmacológicos y toxicológicos de los mismos al utilizarse dichos excipientes.

HBV, HCC y MDR

La proteína X del HBV desempeña un rol principal en la oncogénesis hepática (Feitelson et al., 2005). De acuerdo a este concepto, diversos autores han reportado que dicha proteína se encuentra involucrada en la progresión del ciclo celular, la modulación de la apoptosis y la inmortalización (Bouchard et al., 2004). Asimismo, es capaz de transactivar la transcripción de genes celulares a través de dos mecanismos: la regulación de los niveles de Ca^{+2} intracelular y su unión a diversos factores de transcripción (Shih et al., 2000; Bouchard et al., 2004). Con respecto a esto último, se

demostró que tanto la proteína X salvaje como la mutada en los codones 127, 130 y 131, pueden unirse eficazmente al factor de transcripción celular HNF1 tanto *in vitro* como *in vivo.* A través de este mecanismo HBx aumenta la unión de dicho factor al ADN celular ejerciendo su efecto transactivador en la expresión génica. Interesantemente -y a diferencia de la proteína X salvaje- se necesita una muy escasa cantidad de la proteína mutada para estimular la actividad de HNF1 (Li et al., 2002). Estas diferencias funcionales entre ambas proteínas pueden tener importantes implicancias en la patogénesis de la infección por HBV y podrían explicar el hecho de que aquellos pacientes con infección crónica por una cepa del HBV que presenta estas mutaciones tienen un mayor riesgo de desarrollar HCC (Kao et al., 2003). Asimismo, hasta el presente son pocos los estudios que comparan el efecto de la proteína X salvaje y mutada con el de un sistema *in vitro* que simule la replicación del HBV en su conjunto. Con relación a esto fue objetivo de la presente tesis doctoral investigar la acción de la replicación *in vitro* del HBV y de las proteínas X salvaje y mutada del virus homónimo en relación a la expresión de diferentes proteínas celulares implicadas en el transporte de drogas antivirales y cuya disfunción se asocia frecuentemente a resistencia a la terapéutica; como así también sobre la expresión de genes implicados en la apoptosis, proliferación e inmortalización celular. Para lo cual, en la presente tesis doctoral, se expresó transitoriamente en células de estirpe hepatocitaria el gen *X* tanto de una cepa del HBV salvaje como de otra que exhibe las mutaciones I127T, K130M y V131I, con el objeto de estudiar el rol de dicha proteína viral en la génesis del HCC y el fenotipo MDR.

Como se mencionó anteriormente, otros autores (Li et al., 2002) documentaron además diferencias en la capacidad transactivadora de X en función de la cantidad de proteína expresada; por lo que se realizaron todas los estudios con dos niveles de expresión de dichas proteínas virales.

Se documentó una relación entre la cantidad de proteína X expresada -independientemente de su naturaleza salvaje o mutada- y la inducción de la expresión de genes anti-apoptóticos. Se observó que altos niveles de expresión de X*sal* y X*mut* aumentaron la expresión de los genes anti-apoptóticos *bcl-2*, *c-IAP1*, *c-IAP2* y *ganquirina*; mientras que bajos niveles de expresión de ambas proteínas virales disminuyeron la expresión de algunos de estos genes, no presentando efecto significativo sobre los restantes. Mientras que existen reportes que demuestran el efecto transactivador de la proteína X -de naturaleza salvaje- sobre la expresión de *bcl-2* (Xu et

al., 2012; Yang et al., 2012); hasta la presentación de esta tesis se desconocía el efecto de dicha proteína viral sobre la expresión de los genes *c-IAP1*, *c-IAP2* y *ganquirina*. Estos datos se correlacionaron con los obtenidos con el sistema de replicación *in vitro* del HBV, a excepción de lo documentado en la expresión de tanquirasa. Esta proteína es una poli-ADP-ribosiltransferasa (PARP) que mejora el acceso de la telomerasa a los telómeros (Gao et al., 2011). La sobre-expresión de tanquirasa conduce a un aumento en la longitud de los telómeros a través de la actividad de la telomerasa, permitiendo así que la célula evite la señal de inducción de la senescencia debida a la pérdida de las secuencias teloméricas (Cook et al., 2002). Además, tanquirasa también está implicada en varios procesos celulares como la vía de señalización de Wnt/β-Catenina, cuya desregulación ha sido implicada en muchos tipos de cáncer. Aunque, se ha demostrado que tanquirasa se encuentra sobre-expresada en tumores humanos (Hsiao y Smith, 2008) -lo que indica un papel directo de esta proteína en la carcinogénesis- hasta el presente se desconoce el efecto de la replicación de HBV o la expresión de proteínas virales aisladas sobre la expresión de dicha PARP. En este trabajo de tesis, esta proteína celular se encontró sobre-expresada en células de estirpe hepatocitaria que expresaban la proteína X aislada -tanto salvaje como mutada- mientras que su expresión se vio disminuida por efecto de la replicación viral en su conjunto. Esto implicaría que otras proteínas del HBV podrían ejercer efectos antagónicos a los producidos por la proteína X con relación a la expresión de tanquirasa.

Entre otras de las alteraciones más frecuentemente observadas en el HCC, se encuentran la sobre-expresión de c-Myc y de h-TERT (Fu et al., 2006; Satra et al., 2007; Saini et al., 2009; Kaposi-Novak et al., 2009). **En este trabajo de tesis doctoral se documentó la sobre-expresión de c-Myc en las células de estirpe hepatocitaria que expresaban la proteína X -tanto salvaje como mutada- independientemente del nivel de expresión de dicha proteína viral.** Según reportes previos de otros autores HBx induciría la expresión de c-Myc al activar la cascada de transducción de señales de Ras/Raf/ERK1/2 (Li et al., 2010). Cabe destacar que a diferencia de lo documentado por diversos autores (Zhang et al., 2009; Liu et al., 2010; Hernández et al., 2012), no hemos observado un aumento en la expresión de telomerasa. Ello puede atribuirse a los distintos sistemas de expresión (transitorio *vs* estable) y/o líneas celulares empleadas, así como los distintos genotipos de X implicados entre los diferentes sistemas de experimentación. Además, es importante mencionar que la mayoría de los estudios publicados estudiaron el efecto de HBx sobre la actividad de telomerasa y no sobre los

niveles de su ARNm. Si bien en la presente tesis no se ha documentado un aumento en la expresión de dicha oncoproteína, no se descarta el efecto que HBx podría ejercer sobre la actividad de la misma.

Como se ha reportado en estudios previos la proteína HBx presentaría la interesante habilidad de inducir o inhibir la apoptosis durante el curso de la infección crónica por HBV, dependiendo si el hígado está en activa regeneración o los hepatocitos están bajo un proceso de transformación celular, o incluso si están respondiendo a citoquinas como el TNF-α (Ye et al., 2007; Ye et al., 2008; Siddhartha et al., 2012; Yang y Cho, 2012). Es así como otros autores han documentado la activación o inhibición de la actividad de caspasa 3 en cultivos celulares que expresaban dicha proteína viral. En la presente tesis se documentó ese mismo efecto dual en la expresión de caspasa 3 debido a la expresión de HBx mutada; mientras que con la proteína viral de naturaleza salvaje solo se reportó la disminución en la expresión de dicha serin-proteasa (Mao et al., 2011). Un hallazgo interesante fue el aumento considerable en la expresión de caspasa 9 a las 24 h de expresión transitoria de la proteína X (mutante y salvaje). Estos datos se correlacionaron con los obtenidos con el sistema de replicación *in vitro* de HBV.

Existen escasos reportes en la literatura internacional que documentan la acción transactivadora de la proteína HBx sobre diversas proteínas ABC (Lian et al., 2001; Han et al., 2007), alterando la sensibilidad a las drogas en las células infectadas; aunque se desconoce hasta el momento si existen diferencias en la génesis del fenotipo MDR entre ambas proteínas X (salvaje *vs* mutada). Con respecto al efecto sobre estos transportadores **se ha documentado que tanto X*mut* como X*sal* aumentaron la expresión de BCRP, mientras que la expresión de MRP1 sólo fue afectada por la proteína X de naturaleza mutante. Ambas proteínas virales no modificaron la expresión de MDR1.** Estos hallazgos fueron independientes de la cantidad de HBx expresada pero dependientes de la naturaleza salvaje o mutada de dicha proteína viral. En las células HepG2.2.15 se documentó la variación en la expresión de las tres bombas ABC estudiadas debido a la replicación viral. Es importante destacar la falta de correlación entre las células que expresaban HBx transitoriamente y las células del replicón de HBV, en relación a los niveles de expresión de BCRP. En la literatura internacional existen reportes que han documentado un “efecto compensatorio” en la expresión de diversas bombas ABC, por el cual el aumento en la expresión de una bomba perteneciente a una sub-familia determinada puede devenir en la disminución

concomitante de un transportador perteneciente a otra sub-familia (Takenaka et al., 2007). Este mecanismo podría explicar lo documentado en esta tesis con relación a lo observado en los niveles de expresión de MDR1 y BCRP en las células del replicón de HBV. Sería interesante realizar estudios *ex-vivo* en pacientes crónicamente infectados con HBV para determinar el nivel de expresión de dichos transportadores.

Existen reportes que han postulado que la sobre-expresión de MDR1 y/o MRP1 se correlaciona con una inhibición de la vía intrínseca de la apoptosis al bloquear la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citosol (Fantappiè et al., 2007), lo cual contribuiría a la oncogénesis. Además se ha observado que el secuestro de p53 por parte de X se asocia a un aumento de la proteína MDR1, por lo cual podría postularse la hipótesis de un evento análogo para MRP1. Por otro lado, si bien un eventual papel de altos niveles de expresión de BCRP en la carcinogénesis del hígado queda por ser explorado, bajos niveles de este transportador podrían estar asociados con fenómenos colestásicos (Sukowati et al., 2012).

Finalmente, en cuanto a las discrepancias en los resultados obtenidos con las células HepG2.2.15 –que presentan expresión y replicación estable del HBV– y con los cultivos con expresión transitoria de la proteína X se debe señalar: (i) la presencia de diferentes factores nucleares que regulan la expresión de las proteínas ABC y las proteínas apoptóticas/anti-apoptóticas estudiadas comparado con las células Huh7; (ii) la expresión exclusiva de la proteína HBx en las células Huh7 a diferencia del efecto global de la expresión del genoma completo del HBV en células HepG2.2.15; (iii) la participación de diferentes genotipos del HBV, ya que tanto la proteína X salvaje como la mutada se corresponden con el ADN del HBV de genotipo F (clúster 1b), mientras que las células HepG2.2.15 presentan un genoma perteneciente al subgenotipo D3 (Wang et al., 2011); y (iv) la integración del genoma del HBV al genoma celular en las células del replicón.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

A continuación, se mencionan las principales conclusiones a las que se arribó en esta tesis doctoral:

- ✓ Los co-polímeros estudiados -tanto en forma de unímero como de micela- contribuyen a la quimiosensibilización de líneas celulares de estirpe hepatocitaria provenientes de hepatoma humano, mediante la disminución en la expresión de BCRP y la disminución de la síntesis del ATP necesario para la actividad funcional de dicha bomba, como consecuencia del efecto de los co-polímeros sobre el $\Delta\Psi_m$.

- ✓ Todos los co-polímeros estudiados probaron tener actividad antiviral, lo que permite demostrar la versatilidad de estos surfactantes como potenciales adyuvantes en la terapia del HBV y HCC.

- ✓ El derivado purínico fue el único de los 4 análogos nucleosídicos ensayados en presentar actividad anti-HBV. Sin embargo, no debe descartarse que los otros compuestos -como enantiómeros puros- tengan actividad frente a este virus hepatotrópico.

- ✓ Se deberían evaluar exhaustivamente los efectos farmacogenómicos de los materiales poliméricos empleados en la formulación de drogas antivirales y antitumorales con el fin de optimizar los resultados clínicos y comprender los efectos farmacológicos y toxicológicos de las formulaciones medicamentosas preparadas con dichos excipientes.

- ✓ Niveles elevados de X -independientemente de su naturaleza salvaje o mutada- inhibirían la apoptosis mientras que bajos niveles de esta proteína la promoverían.

- ✓ El presente trabajo compara por primera vez el rol de la proteína X -de tipo salvaje y su triple mutante- y la replicación viral en su conjunto en relación a la expresión de algunas bombas ABC implicadas en el transporte hacia el extra-

celular de drogas antivirales y antitumorales, como así también en relación a la expresión de genes involucrados en la apoptosis, transformación e inmortalización celular.

- ✓ Estos resultados proporcionan información adicional y una mayor comprensión sobre el rol de HBxAg en la patogénesis viral y en la génesis del fenotipo MDR afectando probablemente la respuesta a la terapéutica.

PERSPECTIVAS

PERSPECTIVAS

- ✓ Estudios futuros empleando preparaciones mixtas de estos compuestos anfifílicos se llevarán a cabo con el fin de evaluar si dichas mezclas son más efectivas como agentes quimiosensibilizantes y antivirales (ej: T904 + T1107).

- ✓ Se realizarán por síntesis química modificaciones en la superficie de dichas moléculas anfífilicas con el objeto de poder direccionar la droga al hígado (ej: con azúcares como manosa y galactosa).

- ✓ Se estudiarán formulaciones co-polímero/droga antiviral con el objeto de determinar si dicha formulación se traduce en una mejoría en la eficacia de la farmacoterapia antiviral. Para esto se utilizarán el co-polímero y el carbonucleósido que presentaron mayor actividad antiviral (F127 y derivado purínico).

- ✓ Se harán ensayos de farmacomodulación sobre el derivado purínico a fin de mejorar la actividad antiviral de dicho compuesto.

- ✓ Se estudiará si los co-polímeros son capaces de revertir el fenotipo MDR debido a la sobre-expresión de factores angiogénicos, la principal causa de resistencia celular al sorafenib (antitumoral actualmente más empleado en el tratamiento del HCC).

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

Abou-Alfa GK, Johnson P, Knox JJ, Capanu M, Davidenko I, Lacava J, Leung T, Gansukh B and Saltz LB. Doxorubicin plus sorafenib vs doxorubicin alone in patients with advanced hepatocellular carcinoma: a randomized trial. Jama 2010, 304 (19): 2154-60

Abramovitch R, Tavor E, Jacob-Hirsch J, Zeira E, Amariglio N, Pappo O, Rechavi G, Galun E and Honigman A. A pivotal role of cyclic AMP-responsive element binding protein in tumor progression. Cancer Res 2004, 64 (4): 1338-46

Alakhov V, Moskaleva E, Batrakova EV and Kabanov AV. Hypersensitization of multidrug resistant human ovarian carcinoma cells by pluronic P85 block copolymer. Bioconjug Chem 1996, 7 (2): 209-16

Alakhova DY, Rapoport NY, Batrakova EV, Timoshin AA, Li S, Nicholls D, Alakhov VY and Kabanov AV. Differential metabolic responses to pluronic in MDR and non-MDR cells: a novel pathway for chemosensitization of drug resistant cancers. J Control Release 2010, 142 (1): 89-100

Alexander JJ, Bey EM, Geddes EW and Lecatsas G. Establishment of a continuously growing cell line from primary carcinoma of the liver. S Afr Med J 1976, 50 (54): 2124-8

Alexia C, Fallot G, Lasfer M, Schweizer-Groyer G and Groyer A. An evaluation of the role of insulin-like growth factors (IGF) and of type-I IGF receptor signalling in hepatocarcinogenesis and in the resistance of hepatocarcinoma cells against drug-induced apoptosis." Biochem Pharmacol 2004, 68 (6): 1003-15

Allen JD and Schinkel AH. Multidrug resistance and pharmacological protection mediated by the breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). Mol Cancer Ther 2002, 1 (6): 427-34

Altenberg GA. The engine of ABC proteins. News Physiol Sci 2003, 18 191-5

Alvarez-Lorenzo C, Gonzalez-Lopez J, Fernandez-Tarrio M, Sandez-Macho I and Concheiro A. Tetronic micellization, gelation and drug solubilization: Influence of pH and ionic strength. Eur J Pharm Biopharm 2007, 66 (2): 244-52

Alvarez-Lorenzo C, Rey-Rico A, Brea J, Loza MI, Concheiro A and Sosnik A. Inhibition of P-glycoprotein pumps by PEO-PPO amphiphiles: branched versus linear derivatives. Nanomedicine (Lond) 2010, 5 (9): 1371-83

Alves RC, Alves D, Guz B, Matos C, Viana M, Harriz M, Terrabuio D, Kondo M, Gampel O and Polletti P. Advanced hepatocellular carcinoma. Review of targeted molecular drugs. Ann Hepatol 2011, 10 (1): 21-7

Angus P. Vaughan R, Xiong S, Yang H, Delaney W, Gibbs C, Brosgart C, Colledge D, Edwards R, Ayres A, Bartholomeusz A and Locarnini S. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with selection of a novel mutation in the HBV polymerase. Gastroenterol 2003, 125 (2): 292-7

Annilo T, Chen ZQ, Shulenin S, Costantino J, Thomas L, Lou H, Stefanov S and Dean M. Evolution of the vertebrate ABC gene family: analysis of gene birth and death. Genomics 2006, 88 (1): 1-11

Arancia G, Molinari A, Calcabrini A, Meschini S and Cianfriglia M. Intracellular P-glycoprotein in multidrug resistant tumor cells. Ital J Anat Embryol 2001, 106 (2 Suppl 1): 59-68

Aravalli RN, Steer CJ and Cressman EN. Molecular mechanisms of hepatocellular carcinoma. Hepatology 2008, 48 (6): 2047-63

Atadja P, Watanabe T, Xu H and Cohen D. PSC-833, a frontier in modulation of P-glycoprotein mediated multidrug resistance. Cancer Metastasis Rev 1998, 17 (2): 163-8

Ávila MA, Berasain C, Sangro B and Prieto J. New therapies for hepatocellular carcinoma. Oncogene 2006, 25 (27): 3866-84

Balsano C and Alisi A. Viral hepatitis B: established and emerging therapies. Curr Med Chem 2008, 15 (9): 930-9

Baptista M, Kramvis A and Kew MC. High prevalence of 1762(T) 1764(A) mutations in the basic core promoter of hepatitis B virus isolated from black Africans with hepatocellular carcinoma compared with asymptomatic carriers. Hepatology 1999, 29 (3): 946-53

Barbini L, Tadey L, Fernandez S, Bouzas B and Campos R. Molecular characterization of hepatitis B virus X gene in chronic hepatitis B patients. Virol J 2012, 9 131

Batrakova E, Lee S, Li S, Venne A, Alakhov V and Kabanov A. Fundamental relationships between the composition of pluronic block copolymers and their hypersensitization effect in MDR cancer cells. Pharm Res 1999, 16 (9): 1373-9

Batrakova EV, Li S, Elmquist WF, Miller DW, Alakhov VY and Kabanov AV. Mechanism of sensitization of MDR cancer cells by Pluronic block copolymers: Selective energy depletion. Br J Cancer 2001, 85 (12): 1987-97

Batrakova EV, Li S, Alakhov VY, Elmquist WF, Miller DW and Kabanov AV. Sensitization of cells overexpressing multidrug-resistant proteins by pluronic P85. Pharm Res 2003, 20 (10): 1581-90

Batrakova EV, Li S, Alakhov VY, Miller DW and Kabanov AV. Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells. J Pharmacol Exp Ther 2003, 304 (2): 845-54

Batrakova EV, Li S, Li Y, Alakhov VY, Elmquist WF and Kabanov AV. Distribution kinetics of a micelle-forming block copolymer Pluronic P85. J Control Release 2004, 100 (3): 389-97

Batrakova EV and Kabanov AV. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. J Control Release 2008, 130 (2): 98-106

Beerheide W, Tan YJ, Teng E, Ting AE, Jedpiyawongse A and Srivatanakul P. Downregulation of proapoptotic proteins Bax and Bcl-X(S) in p53 overexpressing hepatocellular carcinomas. Biochem Biophys Res Commun 2000, 273 (1): 54-61

Bengochea A, de Souza MM, Lefrancois L, Le Roux E, Galy O, Chemin I, Kim M, Wands JR, Trepo C, Hainaut P, Scoazec JY, Vitvitski L and Merle P. Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma. Br J Cancer 2008, 99 (1): 143-50

Bergmeyer HU, Horder M and Rej R. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Committee, Analytical Section: approved recommendation (1985) on IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 3. IFCC method for alanine aminotransferase (L-alanine: 2-oxoglutarate aminotransferase, EC 2.6.1.2). J Clin Chem Clin Biochem 1986, 24 (7): 481-95

Blagosklonny MV. Targeting cancer cells by exploiting their resistance. Trends Mol Med 2003, 9 (7): 307-12

Block TM, Mehta AS, Fimmel CJ and Jordan R. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. Oncogene 2003, 22 (33): 5093-107

Bonin S, Pascolo L, Croce LS, Stanta G and Tiribelli C. Gene expression of ABC proteins in hepatocellular carcinoma, perineoplastic tissue, and liver diseases. Mol Med 2002, 8 (6): 318-25

Borst P, Evers R, Kool M and Wijnholds J. A family of drug transporters: the multidrug resistance-associated proteins. J Natl Cancer Inst 2000, 92 (16): 1295-302

Bosch FX, Ribes J, Diaz M and Cleries R. Primary liver cancer: worldwide incidence and trends. Gastroenterology 2004, 127 (5 Suppl 1): S5-S16

Bouchard MJ and Schneider RJ. The enigmatic X gene of hepatitis B virus. J Virol 2004, 78 (23): 12725-34

Boumendjel A, Baubichon-Cortay H, Trompier D, Perrotton T and Di Pietro A. Anticancer multidrug resistance mediated by MRP1: recent advances in the discovery of reversal agents. Med Res Rev 2005, 25 (4): 453-72

Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem 1976, 72 248-54

Bradshaw DM and Arceci RJ. Clinical relevance of transmembrane drug efflux as a mechanism of multidrug resistance. J Clin Oncol 1998, 16 (11): 3674-90

Breedveld P, Beijnen JH and Schellens JH. Use of P-glycoprotein and BCRP inhibitors to improve oral bioavailability and CNS penetration of anticancer drugs. Trends Pharmacol Sci 2006, 27 (1): 17-24

Bruix J, Llovet JM, Castells A, Montana X, Bru C, Ayuso MC, Vilana R and Rodes J. Transarterial embolization versus symptomatic treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma: results of a randomized, controlled trial in a single institution. Hepatology 1998, 27 (6): 1578-83

Bruix J and Llovet JM. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. J Hepatol 2003, 39 Suppl 1 S59-63

Bruix J and Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma. Hepatology 2005, 42 (5): 1208-36

Bruix J and Sherman M. Management of hepatocellular carcinoma: an update. Hepatology 2011, 53 (3): 1020-2

Bush JA and Li G. Cancer chemoresistance: the relationship between p53 and multidrug transporters. Int J Cancer 2002, 98 (3): 323-30

Butterfield LH. Recent advances in immunotherapy for hepatocellular cancer. Swiss Med Wkly 2007, 137 (5-6): 83-90

Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Conner EA, Lee JS, Factor VM and Thorgeirsson SS. Ubiquitous activation of Ras and Jak/Stat pathways in human HCC. Gastroenterology 2006, 130 (4): 1117-28

Calvisi DF, Ladu S, Gorden A, Farina M, Lee JS, Conner EA, Schroeder I, Factor VM and Thorgeirsson SS. Mechanistic and prognostic significance of aberrant methylation in the molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. J Clin Invest 2007, 117 (9): 2713-22

Chang TT, Lai CL, Kew Yoon S, Lee SS, Coelho HS, Carrilho FJ, Poordad F, Halota W, Horsmans Y, Tsai N, Zhang H, Tenney DJ, Tamez R and Iloeje U. Entecavir treatment for up to 5 years in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. Hepatology 2010, 51 (2): 422-30

Chang W, Dynek JN and Smith S. TRF1 is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after release from telomeres.Genes Dev 2003, 17 (11): 1328-33

Cheng AS, Yu J, Lai PB, Chan HL and Sung JJ. COX-2 mediates hepatitis B virus X protein abrogation of p53-induced apoptosis. Biochem Biophys Res Commun 2008, 374 (2): 175-80

Chiappetta DA and Sosnik A. Poly(ethylene oxide)-poly(propylene oxide) block copolymer micelles as drug delivery agents: improved hydrosolubility, stability and bioavailability of drugs. Eur J Pharm Biopharm 2007, 66 (3): 303-17

Chin KV, Ueda K, Pastan I and Gottesman MM. Modulation of activity of the promoter of the human MDR1 gene by Ras and p53. Science 1992, 255 (5043): 459-62

Chiu CM, Yeh SH, Chen PJ, Kuo TJ, Chang CJ, Chen PJ, Yang WJ and Chen DS. Hepatitis B virus X protein enhances androgen receptor-responsive gene expression depending on androgen level. Proc Natl Acad Sci USA 2007, 104 (8): 2571-8

Choi CS, Cho EY, Park R, Kim SJ, Cho JH and Kim HC. X gene mutations in hepatitis B patients with cirrhosis, with and without hepatocellular carcinoma. J Med Virol 2009, 81 (10): 1721-5

Chou YY, Cheng AL and Hsu HC. Expression of P-glycoprotein and p53 in advanced hepatocellular carcinoma treated by single agent chemotherapy: clinical correlation. J Gastroenterol Hepatol 1997, 12 (8): 569-75

Choudhuri S and Klaassen CD. Structure, function, expression, genomic organization, and single nucleotide polymorphisms of human ABCB1 (MDR1), ABCC (MRP), and ABCG2 (BCRP) efflux transporters. Int J Toxicol 2006, 25 (4): 231-59

Cisternino S, Mercier C, Bourasset F, Roux F and Scherrmann JM. Expression, up-regulation, and transport activity of the multidrug-resistance protein Abcg2 at the mouse blood-brain barrier. Cancer Res 2004, 64 (9): 3296-301

Claviere C, Bronowicki JP, Hudziak H, Bigard MA and Gaucher P. [Role of sex steroids and their receptors in the pathophysiology of hepatocellular carcinoma]. Gastroenterol Clin Biol 1998, 22 (1): 73-86

Colak D, Chishti MA, Al-Bakheet AB, Al-Qahtani A, Shoukri MM, Goyns MH, Ozand PT, Quackenbush J, Park BH and Kaya N. Integrative and comparative genomics analysis of early hepatocellular carcinoma differentiated from liver regeneration in young and old. Mol Cancer 2010, 9: 146.

Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, Stewart AJ, Kurz EU, Duncan AM and Deeley RG. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. Science 1992, 258 (5088): 1650-4

Cole SP, Sparks KE, Fraser K, Loe DW, Grant CE, Wilson GM and Deeley RG. Pharmacological characterization of multidrug resistant MRP-transfected human tumor cells. Cancer Res 1994, 54 (22): 5902-10

Cole SP and Deeley RG. Multidrug resistance mediated by the ATP-binding cassette transporter protein MRP. Bioessays 1998, 20 (11): 931-40

Cong YS, Wright WE and Shay JW. Human telomerase and its regulation. Microbiol Mol Biol Rev 2002, 66 (3): 407-25, table of contents

Cook MB, Dawsey SM, Freedman ND, Inskip PD, Wichner SM, Quraishi SM, Devesa SS, and Mc GlynnKA. Sex disparities in cancer incidence by period and age. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 2009, 18 (4): 1174-82

Cooksley WG, Piratvisuth T, Lee SD, Mahachai V, Chao YC, Tanwandee T, Chutaputti A, Chang WY, Zahm FE and Pluck N. Peginterferon alpha-2a (40 kDa): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. J Viral Hepat 2003, 10 (4): 298-305

Cortes J and Baselga J. Targeting the microtubules in breast cancer beyond taxanes: the epothilones. Oncologist 2007, 12 (3): 271-80

Cuestas ML, Sosnik A and Mathet VL. Poloxamines display a multiple inhibitory activity of ATP-binding cassette (ABC) transporters in cancer cell lines. Mol Pharm 2011, 8 (4): 1152-64

Cuestas ML, Castillo AI, Sosnik A and Mathet VL. Downregulation of mdr1 and abcg2 genes is a mechanism of inhibition of efflux pumps mediated by polymeric amphiphiles. Bioorg Med Chem Lett 2012, 22 (21): 6577-9

Custer B, Sullivan SD, Hazlet TK, Iloeje U, Veenstra DL and Kowdley KV. Global epidemiology of hepatitis B virus. J Clin Gastroenterol 2004, 38 (10 Suppl 3): S158-68

Czerski L and Nuñez G. Apoptosome formation and caspase activation: is it different in the heart? J Mol Cell Cardiol 2004, 37 (3): 643-52

Dart DA, Picksley SM, Cooper PA, Double JA and Bibby MC. The role of p53 in the chemotherapeutic responses to cisplatin, doxorubicin and 5-fluorouracil treatment. Int J Oncol 2004, 24 (1): 115-25

Dassa E and Bouige P. The ABC of ABCS: a phylogenetic and functional classification of ABC systems in living organisms. Res Microbiol 2001, 152 (3-4): 211-29

Datta S, Banerjee A, Chandra PK, Biswas A, Panigrahi R, Mahapatra PK, Panda CK, Chakrabarti S, Bhattacharya SK and Chakravarty R. Analysis of hepatitis B virus X gene phylogeny, genetic variability and its impact on pathogenesis: implications in Eastern Indian HBV carriers. Virology 2008, 382 (2): 190-8

Davidson AL and Chen J. ATP-binding cassette transporters in bacteria. Annu Rev Biochem 2004, 73 241-68

de Almagro MC and Vucic D. The inhibitor of apoptosis (IAP) proteins are critical regulators of signaling pathways and targets for anti-cancer therapy. Exp Oncol 34 (3): 200-11

Dean M, Hamon Y and Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. J Lipid Res 2001, 42 (7): 1007-17

Deeley RG, Westlake C and Cole SP. Transmembrane transport of endo- and xenobiotics by mammalian ATP-binding cassette multidrug resistance proteins. Physiol Rev 2006, 86 (3): 849-99

Desbois-Mouthon C, Cadoret A, Blivet-Van Eggelpoel MJ, Bertrand F, Cherqui G, Perret C and Capeau J. Insulin and IGF-1 stimulate the beta-catenin pathway through two signalling cascades involving GSK-3beta inhibition and Ras activation. Oncogene 2001, 20 (2): 252-9

Devarajan E, Sahin AA, Chen JS, Krishnamurthy RR, Aggarwal N, Brun AM, Sapino A, Zhang F, Sharma D, Yang XH, Tora AD and Mehta K. Down-regulation of caspase 3 in breast cancer: a possible mechanism for chemoresistance. Oncogene 2002, 21 (57): 8843-51

Di Maio M, De Maio E, Morabito A, D'Aniello R, De Feo G, Gallo C and Perrone F. Hormonal treatment of human hepatocellular carcinoma. Ann N Y Acad Sci 2006, 1089 252-61

Diestra JE, Scheffer GL, Catala I, Maliepaard M, Schellens JH, Scheper RJ, Germa-Lluch JR and Izquierdo MA. Frequent expression of the multi-drug resistance-associated protein BCRP/MXR/ABCP/ABCG2 in human tumours detected by the BXP-21 monoclonal antibody in paraffin-embedded material. J Pathol 2002, 198 (2): 213-9

Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK and Ross DD. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. Proc Natl Acad Sci U S A 1998, 95 (26): 15665-70

Dussault I, Lin M, Hollister K, Wang EH, Synold TW and Forman BM. Peptide mimetic HIV protease inhibitors are ligands for the orphan receptor SXR. J Biol Chem 2001, 276 (36): 33309-12

El-Serag HB and Rudolph KL. Hepatocellular carcinoma: epidemiology and molecular carcinogenesis. Gastroenterology 2007, 132 (7): 2557-76

Fabregat I. Dysregulation of apoptosis in hepatocellular carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2009, 15 (5): 513-20

Fabregat I, Roncero C and Fernandez M. Survival and apoptosis: a dysregulated balance in liver cancer. Liver Int 2007, 27 (2): 155-62

Fantappie O, Solazzo M, Lasagna N, Platini F, Tessitore L and Mazzanti R. P-glycoprotein mediates celecoxib-induced apoptosis in multiple drug-resistant cell lines. Cancer Res 2007, 67 (10): 4915-23

Farazi PA and DePinho RA. Hepatocellular carcinoma pathogenesis: from genes to environment. Nat Rev Cancer 2006, 6 (9): 674-87

Fassio E, Diaz S, Santa C, Reig ME, Martinez Artola Y, Alves de Mattos A, Miguez C, Galizzi J, Zapata R, Ridruejo E, de Souza FC, Hernandez N and Pinchuk L. Etiology of hepatocellular carcinoma in Latin America: a prospective, multicenter, international study. Ann Hepatol 2010, 9 (1): 63-9

Feitelson MA, Reis HM, Liu J, Lian Z and Pan J. Hepatitis B virus X antigen (HBxAg) and cell cycle control in chronic infection and hepatocarcinogenesis. Front Biosci 2005, 10 1558-72

Feitelson MA, Reis HM, Tufan NL, Sun B, Pan J and Lian Z. Putative roles of hepatitis B x antigen in the pathogenesis of chronic liver disease. Cancer Lett 2009, 286 (1): 69-79

Feng DY, Zheng H, Tan Y and Cheng RX. Effect of phosphorylation of MAPK and Stat3 and expression of c-fos and c-jun proteins on hepatocarcinogenesis and their clinical significance. World J Gastroenterol 2001, 7 (1): 33-6

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C and Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer 2010, 127 (12): 2893-917

Ferry DR, Traunecker H and Kerr DJ. Clinical trials of P-glycoprotein reversal in solid tumours. Eur J Cancer 1996, 32A (6): 1070-81

Fisher GA and Sikic BI. Clinical studies with modulators of multidrug resistance. Hematol Oncol Clin North Am 1995, 9 (2): 363-82

Flens MJ, Zaman GJ, van der Valk P, Izquierdo MA, Schroeijers AB, Scheffer GL, van der Groep P, de Haas M, Meijer CJ and Scheper RJ. Tissue distribution of the multidrug resistance protein. Am J Pathol 1996, 148 (4): 1237-47

Fojo AT, Ueda K, Slamon DJ, Poplack DG, Gottesman MM and Pastan I. Expression of a multidrug-resistance gene in human tumors and tissues. Proc Natl Acad Sci U S A 1987, 84 (1): 265-9

Fojo AT and Menefee M. Microtubule targeting agents: basic mechanisms of multidrug resistance (MDR). Semin Oncol 2005, 32 (6 Suppl 7): S3-8

Forner A, Llovet JM and Bruix J. Hepatocellular carcinoma. Lancet 2012, 379 (9822): 1245-55

Fracasso PM, Goldstein LJ, de Alwis DP, Rader JS, Arquette MA, Goodner SA, Wright LP, Fears CL, Gazak RJ, Andre VA, Burgess MF, Slapak CA and Schellens JH. Phase I study of docetaxel in combination with the P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar, in resistant malignancies. Clin Cancer Res 2004, 10 (21): 7220-8

Francavilla A, Polimeno L, DiLeo A, Barone M, Ove P, Coetzee M, Eagon P, Makowka L, Ambrosino G, Mazzaferro V and et al. The effect of estrogen and tamoxifen on hepatocyte proliferation in vivo and in vitro. Hepatology 1989, 9 (4): 614-20

Fromm MF. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. Eur J Clin Invest 2003, 33 Suppl 2 6-9

Fu XY, Wang HY, Tan L, Liu SQ, Cao HF and Wu MC. Overexpression of p28/gankyrin in human hepatocellular carcinoma and its clinical significance. World J Gastroenterol 2002, 8 (4): 638-43

Fu XM, Yang QX, Shao CK and Feng ZY. [Expressions of h-TERT, c-myc, PCNA and cell apoptosis in liver carcinogenesis]. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao 2006, 26 (6): 821-3

Fung J, Lai CL and Yuen MF. Hepatitis B and C virus-related carcinogenesis. Clin Microbiol Infect 2009, 15 (11): 964-70

Fusco S, Borzacchiello A and Netti A. Perspectives on: PEO-PPO-PEO Triblock Copolymers and their Biomedical Applications. J Bioactive Compatible Polym 2006, 21 (2): 149-64

Ganem D and Prince AM. Hepatitis B virus infection--natural history and clinical consequences. N Engl J Med 2004, 350 (11): 1118-29

Gerrard G, Payne E, Baker RJ, Jones DT, Potter M, Prentice HG, Ethell M, McCullough H, Burgess M, Mehta AB and Ganeshaguru K. Clinical effects and P-glycoprotein inhibition in patients with acute myeloid leukemia treated with zosuquidar trihydrochloride, daunorubicin and cytarabine. Haematologica 2004, 89 (7): 782-90

Ghany M and Liang J. Drug targets and molecular mechanisms of drug resistance in chronic hepatitis B. Gastroenterol 2007, 132 (4): 1574-85

Giaccia AJ and Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. Genes Dev 1998, 12 (19): 2973-83

Gillet JP and Gottesman MM. Mechanisms of multidrug resistance in cancer. Methods Mol Biol 596 47-76

Giménez-Bonafé P, Tortosa A and Perez-Tomas R. Overcoming drug resistance by enhancing apoptosis of tumor cells. Curr Cancer Drug Targets 2009, 9 (3): 320-40

Glavinas H, Krajcsi P, Cserepes J and Sarkadi B. The role of ABC transporters in drug resistance, metabolism and toxicity. Curr Drug Deliv 2004, 1 (1): 27-42

Gollob JA, Wilhelm S, Carter C and Kelley SL. Role of Raf kinase in cancer: therapeutic potential of targeting the Raf/MEK/ERK signal transduction pathway. Semin Oncol 2006, 33 (4): 392-406

Gomaa AI, Khan SA, Toledano MB, Waked I and Taylor-Robinson SD. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors and pathogenesis. World J Gastroenterol 2008, 14 (27): 4300-8

Gong J, Jaiswal R, Mathys JM, Combes V, Grau GE and Bebawy M. Microparticles and their emerging role in cancer multidrug resistance. Cancer Treat Rev 38 (3): 226-34

Gottesman MM, Fojo T and Bates SE. Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nat Rev Cancer 2002, 2 (1): 48-58

Gottlob K, Fulco M, Levrero M and Graessmann A. The hepatitis B virus HBx protein inhibits caspase 3 activity. J Biol Chem 2013, 288 (44): 31915

Green DR and Reed JC. Mitochondria and apoptosis. Science 1998, 281 (5381): 1309-12

(GRETCH) Groupe d'Etude et de Traitement du Carcinome Hepatocellulaire. Randomized trial of leuprorelin and flutamide in male patients with hepatocellular carcinoma treated with tamoxifen. Hepatology 2004, 40 (6): 1361-9

Gruber A, Bjorkholm M, Brinch L, Evensen S, Gustavsson B, Hedenus M, Juliusson G, Lofvenberg E, Nesthus I, Simonsson B, Sjo M, Stenke L, Tangen JM, Tidefelt U, Uden AM, Paul C and Liliemark J. A phase I/II study of the MDR modulator Valspodar (PSC 833) combined with daunorubicin and cytarabine in patients with relapsed and primary refractory acute myeloid leukemia. Leuk Res 2003, 27 (4): 323-8

Guicciardi ME and Gores GJ. Apoptosis: a mechanism of acute and chronic liver injury. Gut 2005, 54 (7): 1024-33

Gurtsevitch VE. Human oncogenic viruses: hepatitis B and hepatitis C viruses and their role in hepatocarcinogenesis. Biochemistry (Mosc) 2008, 73 (5): 504-13

Ha SN, Hochman J and Sheridan RP. Mini review on molecular modeling of P-glycoprotein (Pgp). Curr Top Med Chem 2007, 7 (15): 1525-9

Hadziyannis SJ, Tassopoulos NC, Heathcote EJ, Chang TT, Kitis G, Rizzetto M, Marcellin P, Lim SG, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J and Brosgart CL. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. N Engl J Med 2003, 348 (9): 800-7

Hamidi M, Shahbazi MA and Rostamizadeh K. Copolymers: efficient carriers for intelligent nanoparticulate drug targeting and gene therapy. Macromol Biosci 12 (2): 144-64

Han J, Yoo HY, Choi BH and Rho HM. Selective transcriptional regulations in the human liver cell by hepatitis B viral X protein. Biochem Biophys Res Commun 2000, 272 (2): 525-30

Han HK, Han CY, Cheon EP, Lee J and Kang KW. Role of hypoxia-inducible factor-alpha in hepatitis-B-virus X protein-mediated MDR1 activation. Biochem Biophys Res Commun 2007, 357 (2): 567-73

Hanahan D and Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. Cell 2011, 144 (5): 646-74

Heffelfinger S, Hawkins H, Barrish J, Taylor L and Darlington G. SK HEP-1: a human cell line of endothelial origin. In Vitro Cell Dev Biol 1992, 28A (2): 136-42

Henriksen U, Gether U and Litman T. Effect of Walker A mutation (K86M) on oligomerization and surface targeting of the multidrug resistance transporter ABCG2. J Cell Sci 2005, 118 (Pt 7): 1417-26

Herath NI, Leggett BA and MacDonald GA. Review of genetic and epigenetic alterations in hepatocarcinogenesis. J Gastroenterol Hepatol 2006, 21 (1 Pt 1): 15-21

Hernandez S, Venegas M, Brahm J and Villanueva RA. The viral transactivator HBx protein exhibits a high potential for regulation via phosphorylation through an evolutionarily conserved mechanism. Infect Agent Cancer 2012, 7 (1): 27

Herr I, Schemmer P and Buchler MW. On the TRAIL to therapeutic intervention in liver disease. Hepatology 2007, 46 (1): 266-74

Higashitsuji H, Itoh K, Nagao T, Dawson S, Nonoguchi K, Kido T, Mayer RJ, Arii S and Fujita J. Reduced stability of retinoblastoma protein by gankyrin, an oncogenic ankyrin-repeat protein overexpressed in hepatomas. Nat Med 2000, 6 (1): 96-9

Higashitsuji H, Higashitsuji H, Itoh K, Sakurai T, Nagao T, Sumitomo Y, Masuda T, Dawson S, Shimada Y, Mayer RJ and Fujita J. The oncoprotein gankyrin binds to MDM2/HDM2, enhancing ubiquitylation and degradation of p53. Cancer Cell 2005, 8 (1): 75-87

Higgins CF. ABC transporters: from microorganisms to man. Annu Rev Cell Biol 1992, 8 67-113

Higgins CF. Multiple molecular mechanisms for multidrug resistance transporters. Nature 2007, 446 (7137): 749-57

Hipfner DR, Deeley RG and Cole SP. Structural, mechanistic and clinical aspects of MRP1. Biochim Biophys Acta 1999, 1461 (2): 359-76

Hirohashi T, Suzuki H, Takikawa H and Sugiyama Y. ATP-dependent transport of bile salts by rat multidrug resistance-associated protein 3 (Mrp3). J Biol Chem 2000, 275 (4): 2905-10

Ho JS, Ma W, Mao DY and Benchimol S. p53-Dependent transcriptional repression of c-myc is required for G1 cell cycle arrest. Mol Cell Biol 2005, 25 (17): 7423-31

Hoffmann K, Xiao Z, Franz C, Mohr E, Serba S, Buchler MW and Schemmer P. Involvement of the epidermal growth factor receptor in the modulation of multidrug resistance in human hepatocellular carcinoma cells in vitro. Cancer Cell Int 2011, 11: 40

Houghton PJ, Germain GS, Harwood FC, Schuetz JD, Stewart CF, Buchdunger E and Traxler P. Imatinib mesylate is a potent inhibitor of the ABCG2 (BCRP) transporter and reverses resistance to topotecan and SN-38 in vitro. Cancer Res 2004, 64 (7): 2333-7

Hsia CC, Yuwen H and Tabor E. Hot-spot mutations in hepatitis B virus X gene in hepatocellular carcinoma. Lancet 1996, 348 (9027): 625-6

Hu TH, Huang CC, Lin PR, Chang HW, Ger LP, Lin YW, Changchien CS, Lee CM and Tai MH. Expression and prognostic role of tumor suppressor gene PTEN/MMAC1/TEP1 in hepatocellular carcinoma. Cancer 2003, 97 (8): 1929-40

Huang M and Liu G. The study of innate drug resistance of human hepatocellular carcinoma Bel7402 cell line. Cancer Lett 1999, 135 (1): 97-105

Hung H. Treatment modalities for hepatocellular carcinoma. Curr Cancer Drug Targets 2005, 5 (2): 131-8

Huynh H, Nguyen TT, Chow KH, Tan PH, Soo KC and Tran E. Over-expression of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK in hepatocellular carcinoma: its role in tumor progression and apoptosis. BMC Gastroenterol 2003, 3: 19

Hyams KC. Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection: a review. Clin Infect Dis 1995, 20 (4): 992-1000

Ikeda K, Saitoh S, Arase Y, Chayama K, Suzuki Y, Kobayashi M, Tsubota A, Nakamura I, Murashima N, Kumada H and Kawanishi M. Effect of interferon therapy on hepatocellular carcinogenesis in patients with chronic hepatitis type C: A long-term observation study of 1,643 patients using statistical bias correction with proportional hazard analysis. Hepatology 1999, 29 (4): 1124-30

Ishikawa T and Nakagawa H. Human ABC transporter ABCG2 in cancer chemotherapy and pharmacogenomics. J Exp Ther Oncol 2009, 8 (1): 5-24

Izban KF, Wrone-Smith T, Hsi ED, Schnitzer B, Quevedo ME and Alkan S. Characterization of the interleukin-1beta-converting enzyme/ced-3-family protease, caspase-3/CPP32, in Hodgkin's disease: lack of caspase-3 expression in nodular lymphocyte predominance Hodgkin's disease. Am J Pathol 1999, 154 (5): 1439-47

Janneh O and Khoo SH. Interactions of tenofovir, Lamivudine, abacavir and Didanosine in primary human cells. Pharmaceutics 2011, 3 (2): 326-37

Jette L, Murphy GF and Beliveau R. Drug binding to P-glycoprotein is inhibited in normal tissues following SDZ-PSC 833 treatment. Int J Cancer 1998, 76 (5): 729-37

Jin C, Li H, He Y, He M, Bai L, Cao Y, Song W and Dou K. Combination chemotherapy of doxorubicin and paclitaxel for hepatocellular carcinoma in vitro and in vivo. J Cancer Res Clin Oncol 2010, 136 (2): 267-74

Johnson LV, Walsh ML and Chen LB. Localization of mitochondria in living cells with rhodamine 123. Proc Natl Acad Sci U S A 1980, 77 (2): 990-4

Johnson RA, Shepard EM and Scotto KW. Differential regulation of MDR1 transcription by the p53 family members. Role of the DNA binding domain. J Biol Chem 2005, 280 (14): 13213-9

Jonker JW, Merino G, Musters S, van Herwaarden AE, Bolscher E, Wagenaar E, Mesman E, Dale TC and Schinkel AH. The breast cancer resistance protein BCRP (ABCG2) concentrates drugs and carcinogenic xenotoxins into milk. Nat Med 2005, 11 (2): 127-9

Juliano RL and Ling V. A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants. Biochim Biophys Acta 1976, 455 (1): 152-62

Kabanov AV and Alakhov VY. Pluronic block copolymers in drug delivery: from micellar nanocontainers to biological response modifiers. Crit Rev Ther Drug Carrier Syst 2002, 19 (1): 1-72

Kabanov AV, Batrakova EV and Alakhov VY. Pluronic block copolymers for overcoming drug resistance in cancer. Adv Drug Deliv Rev 2002, 54 (5): 759-79

Kabanov AV, Batrakova EV and Alakhov VY. Pluronic block copolymers as novel polymer therapeutics for drug and gene delivery. J Control Release 2002, 82 (2-3): 189-212

Kabanov AV, Batrakova EV and Alakhov VY. An essential relationship between ATP depletion and chemosensitizing activity of Pluronic block copolymers. J Control Release 2003, 91 (1-2): 75-83

Kamisako T, Leier I, Cui Y, Konig J, Buchholz U, Hummel-Eisenbeiss J and Keppler D. Transport of monoglucuronosyl and bisglucuronosyl bilirubin by recombinant human and rat multidrug resistance protein 2. Hepatology 1999, 30 (2): 485-90

Kao JH, Chen PJ, Lai MY and Chen DS. Basal core promoter mutations of hepatitis B virus increase the risk of hepatocellular carcinoma in hepatitis B carriers. Gastroenterology 2003, 124 (2): 327-34

Kaposi-Novak P, Libbrecht L, Woo HG, Lee YH, Sears NC, Coulouarn C, Conner EA, Factor VM, Roskams T and Thorgeirsson SS. Central role of c-Myc during malignant conversion in human hepatocarcinogenesis. Cancer Res 2009, 69 (7): 2775-82

Kayashima H, Toshima T, Okano S, Taketomi A, Harada N, Yamashita Y, Tomita Y, Shirabe K and Maehara Y. Intratumoral neoadjuvant immunotherapy using IL-12 and dendritic cells is an effective strategy to control recurrence of murine hepatocellular carcinoma in immunosuppressed mice. J Immunol 185 (1): 698-708

Kew MC. Epidemiology of chronic hepatitis B virus infection, hepatocellular carcinoma, and hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma. Pathol Biol 2010, 58 (4): 273-7

Khokhar A and Afdhal NH. Therapeutic strategies for chronic hepatitis B virus infection in 2008. Am J Med 2008, 121 (12 Suppl): S33-44

Kolenko V, Uzzo RG, Bukowski R, Bander NH, Novick AC, Hsi ED and Finke JH. Dead or dying: necrosis versus apoptosis in caspase-deficient human renal cell carcinoma. Cancer Res 1999, 59 (12): 2838-42

Koopman G, Reutelingsperger CP, Kuijten GA, Keehnen RM, Pals ST and van Oers MH. Annexin V for flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on B cells undergoing apoptosis. Blood 1994, 84 (5): 1415-20

Krishna R and Mayer LD. Multidrug resistance (MDR) in cancer. Mechanisms, reversal using modulators of MDR and the role of MDR modulators in influencing the pharmacokinetics of anticancer drugs. Eur J Pharm Sci 2000, 11 (4): 265-83

Kudo M. Adjuvant therapy after curative treatment for hepatocellular carcinoma. Oncology 2011, 81 (l): 50-5

Kuranaga N, Shinomiya N and Mochizuki H. Long-term cultivation of colorectal carcinoma cells with anti-cancer drugs induces drug resistance and telomere elongation: an in vitro study. BMC Cancer 2001, 1 10

Lai CL, Chien RN, Leung NW, Chang TT, Guan R, Tai DI, Ng KY, Wu PC, Dent JC, Barber J, Stephenson SL and Gray DF. A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. N Engl J Med 1998, 339 (2): 61-8

Lai CL, Gane E, Liaw YF, Hsu CW, Thongsawat S, Wang Y, Chen Y, Heathcote EJ, Rasenack J, Bzowej N, Naoumov NV, Di Bisceglie AM, Zeuzem S, Moon YM, Goodman Z, Chao G, Constance BF and Brown NA. Telbivudine versus lamivudine in patients with chronic hepatitis B. N Engl J Med 2007, 357 (25): 2576-88

Lampertico P, Del Ninno E, Vigano M, Romeo R, Donato MF, Sablon E, Morabito A and Colombo M. Long-term suppression of hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B by 24-month interferon therapy. Hepatology 2003, 37 (4): 756-63

Lampertico P. Partial virological response to nucleos(t)ide analogues in naïve patients with chronic hepatitis B: from guidelines to field practice. J Hepatol 2009, 50 (4): 644-7

Langley DR, Walsh AW, Baldick CJ, Eggers BJ, Rose RE, Levine SM, Kapur AJ, Colonno RJ and Tenney DJ. Inhibition of hepatitis B virus polymerase by entecavir. J Virol 2007, 81 (8): 3992-4001

Lau GK, Piratvisuth T, Luo KX, Marcellin P, Thongsawat S, Cooksley G, Gane E, Fried MW, Chow WC, Paik SW, Chang WY, Berg T, Flisiak R, McCloud P and Pluck N. Peginterferon Alfa-2a, lamivudine, and the combination for HBeAg-positive chronic hepatitis B. N Engl J Med 2005, 352 (26): 2682-95

Leicht DT, Balan V, Kaplun A, Singh-Gupta V, Kaplun L, Dobson M and Tzivion T. Raf kinases: function, regulation and role in human cancer. Biochim Biophys Acta 2007, 1773 (8): 1196-212

Leier I, Jedlitschky G, Buchholz U, Cole SP, Deeley RG and Keppler D. The MRP gene encodes an ATP-dependent export pump for leukotriene C4 and structurally related conjugates. J Biol Chem 1994, 269 (45): 27807-10

Leonard GD, Fojo T and Bates SE. The role of ABC transporters in clinical practice. Oncologist 2003, 8 (5): 411-24

Leslie EM, Mao Q, Oleschuk CJ, Deeley RG and Cole SP. Modulation of multidrug resistance protein 1 (MRP1/ABCC1) transport and atpase activities by interaction with dietary flavonoids. Mol Pharmacol 2001, 59 (5): 1171-80

Leslie EM, Deeley RG and Cole SP. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. Toxicol Appl Pharmacol 2005, 204 (3): 216-37

Letchford K and Burt H. A review of the formation and classification of amphiphilic block copolymer nanoparticulate structures: micelles, nanospheres, nanocapsules and polymersomes. Eur J Pharm Biopharm 2007, 65 (3): 259-69

Li J, Xu Z, Zheng Y, Johnson DL and Ou JH. Regulation of hepatocyte nuclear factor 1 activity by wild-type and mutant hepatitis B virus X proteins. J Virol 2002, 76 (12): 5875-81

Li W, Miao X, Qi Z, Zeng W, Liang J and Liang Z. Hepatitis B virus X protein upregulates HSP90alpha expression via activation of c-Myc in human hepatocarcinoma cell line, HepG2. Virol J 2010, 7 45

Lian Z, Liu J, Pan J, Satiroglu Tufan NL, Zhu M, Arbuthnot P, Kew M, Clayton MM and Feitelson MA. A cellular gene up-regulated by hepatitis B virus-encoded X antigen promotes hepatocellular growth and survival. Hepatology 2001, 34 (1): 146-57

Lin SM, Sheen IS, Chien RN, Chu CM and Liaw YF. Long-term beneficial effect of interferon therapy in patients with chronic hepatitis B virus infection. Hepatology 1999, 29 (3): 971-5

Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G and Horal P. Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in East Asian hepatitis B virus carriers. J Infect Dis 1999, 179 (4): 775-82

Lindner DJ. Interferons as antiangiogenic agents. Curr Oncol Rep 2002, 4 (6): 510-4

Liu FS. Mechanisms of chemotherapeutic drug resistance in cancer therapy--a quick review. Taiwan J Obstet Gynecol 2009, 48 (3): 239-44

Liu H, Shi W, Luan F, Xu S, Yang F, Sun W, Liu J and Ma C. Hepatitis B virus X protein upregulates transcriptional activation of human telomerase reverse transcriptase. Virus Genes 2010, 40 (2): 174-82

Llovet JM, Real MI, Montana X, Planas R, Coll S, Aponte J, Ayuso C, Sala M, Muchart J, Sola R, Rodes J and Bruix J. Arterial embolisation or chemoembolisation versus symptomatic treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised controlled trial. Lancet 2002, 359 (9319): 1734-9

Llovet JM and Bruix J. Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. Hepatology 2003, 37 (2): 429-42

Llovet JM. Updated treatment approach to hepatocellular carcinoma. J Gastroenterol 2005, 40 (3): 225-35

Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, Hilgard P, Gane E, Blanc JF, de Oliveira AC, Santoro A, Raoul JL, Forner A, Schwartz M, Porta C, Zeuzem S, Bolondi L, Greten TF, Galle PR, Seitz JF, Borbath I, Haussinger D, Giannaris T, Shan M, Moscovici M, Voliotis D and Bruix J. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. N Engl J Med 2008, 359 (4): 378-90

Llovet JM, Di Bisceglie AM, Bruix J, Kramer BS, Lencioni R, Zhu AX, Sherman M, Schwartz M, Lotze M, Talwalkar J and Gores GJ. Design and endpoints of clinical trials in hepatocellular carcinoma. J Natl Cancer Inst 2008, 100 (10): 698-711

Lo CM, Ngan H, Tso WK, Liu CL, Lam CM, Poon RT, Fan ST and Wong J. Randomized controlled trial of transarterial lipiodol chemoembolization for unresectable hepatocellular carcinoma. Hepatology 2002, 35 (5): 1164-71

Locksley RM, Killeen N and Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. Cell 2001, 104 (4): 487-501

Luo J, Solimini NL and Elledge SJ. Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. Cell 2009, 136 (5): 823-37

Maliepaard M, Scheffer GL, Faneyte IF, van Gastelen MA, Pijnenborg AC, Schinkel AH, van De Vijver MJ, Scheper RJ and Schellens JH. Subcellular localization and distribution of the breast cancer resistance protein transporter in normal human tissues. Cancer Res 2001, 61 (8): 3458-64

Mansilla S, Rojas M, Bataller M, Priebe W and Portugal J. Circumvention of the multidrug-resistance protein (MRP-1) by an antitumor drug through specific inhibition of gene transcription in breast tumor cells. Biochem Pharmacol 2007, 73 (7): 934-42

Mao Y, Da L, Tang H, Yang J, Lei Y, Tiollais P, Li T and Zhao M. Hepatitis B virus X protein reduces starvation-induced cell death through activation of autophagy and inhibition of mitochondrial apoptotic pathway. Biochem Biophys Res Commun 2011, 415 (1): 68-74

Marcellin P, Chang TT, Lim SG, Tong MJ, Sievert W, Shiffman ML, Jeffers L, Goodman Z, Wulfsohn MS, Xiong S, Fry J and Brosgart CL. Adefovir dipivoxil for the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. N Engl J Med 2003, 348 (9): 808-16

Marthinet E, Divita G, Bernaud J, Rigal D and Baggetto LG. Modulation of the typical multidrug resistance phenotype by targeting the MED-1 region of human MDR1 promoter. Gene Ther 2000, 7 (14): 1224-33

Matsuda Y, Ichida T and Fukumoto M. Hepatocellular carcinoma and liver transplantation: clinical perspective on molecular targeted strategies. Med Mol Morphol 2011, 44 (3): 117-24

Mazel M, Clair P, Rousselle C, Vidal P, Scherrmann JM, Mathieu D and Temsamani J. Doxorubicin-peptide conjugates overcome multidrug resistance. Anticancer Drugs 2001, 12 (2): 107-16

McMahon BJ, Alward WL, Hall DB, Heyward WL, Bender TR, Francis DP and Maynard JE. Acute hepatitis B virus infection: relation of age to the clinical expression of disease and subsequent development of the carrier state. J Infect Dis 1985, 151 (4): 599-603

Melegari M, Scaglioni PP and Wands JR. Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. Hepatology 1998, 27 (2): 628-33

Merle P and Trepo C. Molecular mechanisms underlying hepatocellular carcinoma. Viruses 2009, 1 (3): 852-72

Meyer N, Kim SS and Penn LZ. The Oscar-worthy role of Myc in apoptosis. Semin Cancer Biol 2006, 16 (4): 275-87

Midorikawa Y, Yamamoto S, Ishikawa S, Kamimura N, Igarashi H, Sugimura H, Makuuchi M and Aburatani H. Molecular karyotyping of human hepatocellular carcinoma using single-nucleotide polymorphism arrays. Oncogene 2006, 25 (40): 5581-90

Moghimi SM and Hunter AC. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine. Trends Biotechnol 2000, 18 (10): 412-20

Moon WS, Rhyu KH, Kang MJ, Lee DG, Yu HC, Yeum JH, Koh GY and Tarnawski AS. Overexpression of VEGF and angiopoietin 2: a key to high vascularity of hepatocellular carcinoma? Mod Pathol 2003, 16 (6): 552-7

Mottino AD, Hoffman T, Jennes L and Vore M. Expression and localization of multidrug resistant protein mrp2 in rat small intestine. J Pharmacol Exp Ther 2000, 293 (3): 717-23

Murakami Y, Saigo K, Takashima H, Minami M, Okanoue T, Brechot C and Paterlini-Brechot P. Large scaled analysis of hepatitis B virus (HBV) DNA integration in HBV related hepatocellular carcinomas. Gut 2005, 54 (8): 1162-8

Naugler WE, Sakurai T, Kim S, Maeda S, Kim K, Elsharkawy AM and Karin M. Gender disparity in liver cancer due to sex differences in MyD88-dependent IL-6 production. Science 2007, 317 (5834): 121-4

Negro F. Adverse effects of drugs in the treatment of viral hepatitis. Best Pract Res Clin Gastroenterol 2010, 24 (2): 183-92

Neumanova Z, Cerveny L, Ceckova M and Staud F. Interactions of tenofovir and tenofovir disoproxil fumarate with drug efflux transporters ABCB1, ABCG2, and ABCC2; role in transport across the placenta. Aids 2014, 28 (1): 9-17

Neuveut C, Wei Y and Buendia MA. Mechanisms of HBV-related hepatocarcinogenesis. J Hepatol 2010, 52 (4): 594-604

Ng IO, Liu CL, Fan ST and Ng M. Expression of P-glycoprotein in hepatocellular carcinoma. A determinant of chemotherapy response. Am J Clin Pathol 2000, 113 (3): 355-63

Nies AT, Konig J, Pfannschmidt M, Klar E, Hofmann WJ and Keppler D. Expression of the multidrug resistance proteins MRP2 and MRP3 in human hepatocellular carcinoma. Int J Cancer 2001, 94 (4): 492-9

Nobili S, Landini I, Giglioni B and Mini E. Pharmacological strategies for overcoming multidrug resistance. Curr Drug Targets 2006, 7 (7): 861-79

Norbury CJ and Hickson ID. Cellular responses to DNA damage. Annu Rev Pharmacol Toxicol 2001, 41: 367-401

Osborne CK and Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. J Clin Oncol 2005, 23 (8): 1616-22

Oselin K, Mrozikiewicz PM, Pahkla R and Roots I. Quantitative determination of the human MRP1 and MRP2 mRNA expression in FACS-sorted peripheral blood CD4+, CD8+, CD19+, and CD56+ cells. Eur J Haematol 2003, 71 (2): 119-23

Ozvegy-Laczka C, Cserepes J, Elkind NB and Sarkadi B. Tyrosine kinase inhibitor resistance in cancer: role of ABC multidrug transporters. Drug Resist Updat 2005, 8 (1-2): 15-26

Palumbo E. New drugs for chronic hepatitis B: a review. Am J Ther 2008, 15 (2): 167-72

Pan G, Giri N and Elmquist WF. Abcg2/Bcrp1 mediates the polarized transport of antiretroviral nucleosides abacavir and zidovudine. Drug Metab Dispos 2007, 35 (7): 1165-73

Papatheodoridis GV, Petraki K, Cholongitas E, Kanta E, Ketikoglou I and Manesis EK. Impact of interferon-alpha therapy on liver fibrosis progression in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. J Viral Hepat 2005, 12 (2): 199-206

Parada LA, Hallen M, Tranberg KG, Hagerstrand I, Bondeson L, Mitelman F and Johansson B. Frequent rearrangements of chromosomes 1, 7, and 8 in primary liver cancer. Genes Chromosomes Cancer 1998, 23 (1): 26-35

Parikh S and Hyman D. Hepatocellular cancer: a guide for the internist. Am J Med 2007, 120 (3): 194-202

Park JK, Kogure T, Nuovo GJ, Jiang J, He L, Kim JH, Phelps MA, Papenfuss TL, Croce CM, Patel T and Schmittgen TD. miR-221 silencing blocks hepatocellular carcinoma and promotes survival. Cancer Res 2011, 71 (24): 7608-16

Parkin DM. The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. Int J Cancer 2006, 118 (12): 3030-44

Perrillo RP, Schiff ER, Davis GL, Bodenheimer HC, Jr., Lindsay K, Payne J, Dienstag JL, O'Brien C, Tamburro C, Jacobson IM and et al. A randomized, controlled trial of interferon alfa-2b alone and after prednisone withdrawal for the treatment of chronic hepatitis B. The Hepatitis Interventional Therapy Group. N Engl J Med 1990, 323 (5): 295-301

Perrillo R, Schiff E, Yoshida E, Statler A, Hirsch K, Wright T, Gutfreund K, Lamy P and Murray A. Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B mutants. Hepatology 2000, 32 (1): 129-34

Peters M, Walling DM, Waggoner J, Avigan MI, Sjogren M and Hoofnagle JH. Immune effects of alpha-interferon in chronic liver disease. J Hepatol 1986, 3 Suppl 2 S283-9

Petrini M, Di Simone D, Favati A, Mattii L, Valentini P and Grassi B. GST-pi and P-170 co-expression in multiple myeloma. Br J Haematol 1995, 90 (2): 393-7

Poon RT, Lau C, Yu WC, Fan ST and Wong J. High serum levels of vascular endothelial growth factor predict poor response to transarterial chemoembolization in hepatocellular carcinoma: a prospective study. Oncol Rep 2004, 11 (5): 1077-84

Prange W, Breuhahn K, Fischer F, Zilkens C, Pietsch T, Petmecky K, Eilers R, Dienes HP and Schirmacher P. Beta-catenin accumulation in the progression of human hepatocarcinogenesis correlates with loss of E-cadherin and accumulation of p53, but not with expression of conventional WNT-1 target genes. J Pathol 2003, 201 (2): 250-9

Qadri I, Hu LJ, Iwahashi M, Al-Zuabi S, Quattrochi LC and Simon FR. Interaction of hepatocyte nuclear factors in transcriptional regulation of tissue specific hormonal expression of human multidrug resistance-associated protein 2 (abcc2). Toxicol Appl Pharmacol 2009, 234 (3): 281-92

Qian YM, Song WC, Cui H, Cole SP and Deeley RG. Glutathione stimulates sulfated estrogen transport by multidrug resistance protein 1. J Biol Chem 2001, 276 (9): 6404-11

Rahman R, Hammoud GM, Almashhrawi AA, Ahmed KT and Ibdah JA. Primary hepatocellular carcinoma and metabolic syndrome: An update. World J Gastrointest Oncol 2013, 5 (9): 186-94.

Raidl M, Pirker C, Schulte-Hermann R, Aubele M, Kandioler-Eckersberger D, Wrba F, Micksche M, Berger W and Grasl-Kraupp B. Multiple chromosomal abnormalities in human liver (pre)neoplasia. J Hepatol 2004, 40 (4): 660-8

Rang A, Bruns M, Heise T and Will H. Antiviral activity of interferon-alpha against hepatitis B virus can be studied in non-hepatic cells and Is independent of MxA. J Biol Chem 2002, 277 (10): 7645-7

Reijnders JG and Janssen HL. Potency of tenofovir in chronic hepatitis B: mono or combination therapy? J Hepatol 2008, 48 (3): 383-6

Riccardi C and Nicoletti I. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. Nat Protoc 2006, 1 (3): 1458-61

Roberts LR and Gores GJ. Hepatocellular carcinoma: molecular pathways and new therapeutic targets. Semin Liver Dis 2005, 25 (2): 212-25

Rossi L, Zoratto F, Papa A, Iodice F, Minozzi M, Frati L and Tomao S. Current approach in the treatment of hepatocellular carcinoma. World J Gastrointest Oncol 2010, 2 (9): 348-59

Ruff P, Vorobiof DA, Jordaan JP, Demetriou GS, Moodley SD, Nosworthy AL, Werner ID, Raats J and Burgess LJ. A randomized, placebo-controlled, double-blind phase 2 study of docetaxel compared to docetaxel plus zosuquidar (LY335979) in women with metastatic or locally recurrent breast cancer who have received one prior chemotherapy regimen. Cancer Chemother Pharmacol 2009, 64 (4): 763-8

Saini N, Srinivasan R, Chawla Y, Sharma S, Chakraborti A and Rajwanshi A. Telomerase activity, telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression in hepatocellular carcinoma is independent of hepatitis virus status. Liver Int 2009, 29 (8): 1162-70

Salhab M and Canelo R. An overview of evidence-based management of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis. J Cancer Res Ther 2011, 7 (4): 463-75

Sandler A, Gordon M, De Alwis DP, Pouliquen I, Green L, Marder P, Chaudhary A, Fife K, Battiato L, Sweeney C, Jordan C, Burgess M and Slapak CA. A Phase I trial of a potent P-glycoprotein inhibitor, zosuquidar trihydrochloride (LY335979), administered intravenously in combination with doxorubicin in patients with advanced malignancy. Clin Cancer Res 2004, 10 (10): 3265-72

Sarkadi B, Homolya L, Szakacs G and Varadi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. Physiol Rev 2006, 86 (4): 1179-236

Satyanarayana A, Manns MP and Rudolph KL. Telomeres and telomerase: a dual role in hepatocarcinogenesis. Hepatology 2004, 40 (2): 276-83

Sells MA, Chen ML and Acs G. Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. Proc Natl Acad Sci U S A 1987, 84 (4): 1005-9

Seimiya H, Oh-hara T, Suzuki T, Naasani I, Shimazaki T, Tsuchiya K and Tsuruo T. Telomere shortening and growth inhibition of human cancer cells by novel synthethic telomerase inhibitors MST-312, MST-295, and MST-1991. Mol Cancer Ther 2002, 1 (9): 657-65

Seimiya H. The telomeric PARP, tankyrases, as targets for cancer therapy. Br J Cancer 2006, 94 (3): 341-5

Shaik N, Giri N, Pan G and Elmquist WF. P-glycoprotein-mediated active efflux of the anti-HIV1 nucleoside abacavir limits cellular accumulation and brain distribution. Drug Metab Dispos 2007, 35 (11): 2076-85

Sharma AK, Zhang L, Li S, Kelly DL, Alakhov VY, Batrakova EV and Kabanov AV. Prevention of MDR development in leukemia cells by micelle-forming polymeric surfactant. J Control Release 2008, 131 (3): 220-7

Shepard CW, Simard EP, Finelli L, Fiore AE and Bell BP. Hepatitis B virus infection: epidemiology and vaccination. Epidemiol Rev 2006, 28 112-25

Sheps JA and Ling V. Preface: the concept and consequences of multidrug resistance. Pflugers Arch 2007, 453 (5): 545-53

Sherman M. Hepatocellular carcinoma: epidemiology, risk factors, and screening. Semin Liver Dis 2005, 25 (2): 143-54

Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. Mol Cell 2002, 9 (3): 459-70

Shih WL, Kuo ML, Chuang SE, Cheng AL and Doong SL. Hepatitis B virus X protein inhibits transforming growth factor-beta -induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway. J Biol Chem 2000, 275 (33): 25858-64

Shinkai N, Tanaka Y, Ito K, Mukaide M, Hasegawa I, Asahina Y, Izumi N, Yatsuhashi H, Orito E, Joh T and Mizokami M. Influence of hepatitis B virus X and core promoter mutations on hepatocellular carcinoma among patients infected with subgenotype C2. J Clin Microbiol 2007, 45 (10): 3191-7

Shiraha H, Yamamoto K and Namba M. Human hepatocyte carcinogenesis (review). Int J Oncol 2013, 42 (4): 1133-8

Siegel AB, Cohen EI, Ocean A, Lehrer D, Goldenberg A, Knox JJ, Chen H, Clark-Garvey S, Weinberg A, Mandeli J, Christos P, Mazumdar M, Popa E, Brown RS, Jr., Rafii S and Schwartz JD. Phase II trial evaluating the clinical and biologic effects of bevacizumab in unresectable hepatocellular carcinoma. J Clin Oncol 2008, 26 (18): 2992-8

Smith S and de Lange T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. Curr Biol 2000, 10 (20): 1299-302

Snow-Lampart A, Chappell B, Curtis M, Zhu Y, Myrick F, Schawalder J, Kitrinos K, Svarovskaia ES, Miller MD, Sorbel J, Heathcote J, Marcellin P and Borroto-Esoda K. No resistance to tenofovir disoproxil fumarate detected after up to 144 weeks of therapy in patients monoinfected with chronic hepatitis B virus. Hepatology 2009, 53 (3): 763-73

Soini Y, Virkajarvi N, Raunio H and Paakko P. Expression of P-glycoprotein in hepatocellular carcinoma: a potential marker of prognosis. J Clin Pathol 1996, 49 (6): 470-3

Soto-Vega E, Arroyo C, Richaud-Patin Y, Garcia-Carrasco M, Vazquez-Lavista LG and Llorente L. P-glycoprotein activity in renal clear cell carcinoma. Urol Oncol 2009, 27 (4): 363-6

Stavrovskaya AA. Cellular mechanisms of multidrug resistance of tumor cells. Biochemistry (Mosc) 2000, 65 (1): 95-106

Stavrovskaya AA and Stromskaya TP. Transport proteins of the ABC family and multidrug resistance of tumor cells. Biochemistry (Mosc) 2008, 73 (5): 592-604

Stein LL and Loomba R. Drug targets in hepatitis B virus infection. Infect Disord Drug Targets 2009, 9 (2): 105-16

Sukowati CH, Rosso N, Pascut D, Anfuso B, Torre G, Francalanci P, Croce LS and Tiribelli C. Gene and functional up-regulation of the BCRP/ABCG2 transporter in hepatocellular carcinoma. BMC Gastroenterol 2012, 12: 160

Suliman A, Lam A, Datta R and Srivastava RK. Intracellular mechanisms of TRAIL: apoptosis through mitochondrial-dependent and -independent pathways. Oncogene 2001, 20 (17): 2122-33

Summers J and Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B--like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. Cell 1982, 29 (2): 403-15

Sun K, Wang L and Zhang Y. Dendritic cell as therapeutic vaccines against tumors and its role in therapy for hepatocellular carcinoma. Cell Mol Immunol 2006, 3 (3): 197-203

Sung YM, Tang NL, Lai PB, Chan PK and Chan FK. Re: Hormonal markers and hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma risk: a nested case-control study among men. J Natl Cancer Inst 2003, 95 (7): 559-60

Suzuki Y, Nakabayashi Y, Nakata K, Reed JC and Takahashi R. X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) inhibits caspase-3 and -7 in distinct modes. J Biol Chem 2001, 276 (29): 27058-63

Szákacs G, Paterson JK, Ludwig JA, Booth-Genthe C and Gottesman MM. Targeting multidrug resistance in cancer. Nat Rev Drug Discov 2006, 5 (3): 219-34

Takenaka K, Morgan JA, Scheffer GL, Adachi M, Stewart CF, Sun D, Leggas M, Ejendal KF, Hrycyna CA and Schuetz JD. Substrate overlap between Mrp4 and Abcg2/Bcrp affects purine analogue drug cytotoxicity and tissue distribution. Cancer Res 2007, 67 (14): 6965-72

Taniguchi K, Roberts LR, Aderca IN, Dong X, Qian C, Murphy LM, Nagorney DM, Burgart LJ, Roche PC, Smith DI, Ross JA and Liu W. Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. Oncogene 2002, 21 (31): 4863-71

te Boekhorst PA, van Kapel J, Schoester M and Sonneveld P. Reversal of typical multidrug resistance by cyclosporin and its non-immunosuppressive analogue SDZ PSC 833 in Chinese hamster ovary cells expressing the mdr1 phenotype. Cancer Chemother Pharmacol 1992, 30 (3): 238-42

Tenney DJ, Rose RE, Baldick CJ, Pokornowski KA, Eggers BJ, Fang J, Wichroski MJ, Xu D, Yang J, Wilber RB and Colonno RJ. Long-term monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naive patients is rare through 5 years of therapy. Hepatology 2009, 49 (5): 1503-14

Teodori E, Dei S, Scapecchi S and Gualtieri F. The medicinal chemistry of multidrug resistance (MDR) reversing drugs. Farmaco 2002, 57 (5): 385-415

Teufel A, Staib F, Kanzler S, Weinmann A, Schulze-Bergkamen H and Galle PR. Genetics of hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol 2007, 13 (16): 2271-82

Thomas H and Coley HM. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. Cancer Control 2003, 10 (2): 159-65

Thomas HC, Lemon S, Zuckerman AJ. Viral Hepatitis. In: Kann M, Gerlich WH, editors. Structure and molecular virology. 3rd ed. Oxford: Blackwell Publishing 2005, 149-180

Thomas MB and Abbruzzese JL. Opportunities for targeted therapies in hepatocellular carcinoma. J Clin Oncol 2005, 23 (31): 8093-108

Thorgeirsson SS and Grisham JW. Molecular pathogenesis of human hepatocellular carcinoma. Nat Genet 2002, 31 (4): 339-46

Thuerauf N and Fromm MF. The role of the transporter P-glycoprotein for disposition and effects of centrally acting drugs and for the pathogenesis of CNS diseases. Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci 2006, 256 (5): 281-6

Toffoli G, Simone F, Corona G, Raschack M, Cappelletto B, Gigante M and Boiocchi M. Structure-activity relationship of verapamil analogs and reversal of multidrug resistance. Biochem Pharmacol 1995, 50 (8): 1245-55

Twentyman PR and Bleehen NM. Resistance modification by PSC-833, a novel non-immunosuppressive cyclosporin [corrected]. Eur J Cancer 1991, 27 (12): 1639-42

Uggla B, Stahl E, Wagsater D, Paul C, Karlsson MG, Sirsjo A and Tidefelt U. BCRP mRNA expression v. clinical outcome in 40 adult AML patients. Leuk Res 2005, 29 (2): 141-6

Um HR, Lim WC, Chae SY, Park S, Park JH and Cho H. Raf-1 and protein kinase B regulate cell survival through the activation of NF-kappaB in hepatitis B virus X-expressing cells. Virus Res 2007, 125 (1): 1-8

van Bömmel F, de Man RA, Wedemeyer H, Deterding K, Petersen J, Buggisch P, Erhardt A, Huppe D, Stein K, Trojan J, Sarrazin C, Bocher WO, Spengler U, Wasmuth HE, Reinders JG, Moller B, Rhode P, Feucht HH, Wiedenmann B and Berg T. Long-term efficacy of tenofovir monotherapy for hepatitis B virus-monoinfected patients after failure of nucleoside/nucleotide analogues. Hepatology 51 (1): 73-80

van Engeland M, Ramaekers FC, Schutte B and Reutelingsperger CP. A novel assay to measure loss of plasma membrane asymmetry during apoptosis of adherent cells in culture. Cytometry 1996, 24 (2): 131-9

van Gelder J, Deferme S, Naesens L, De Clercq E, van den Mooter G, Kinget R and Augustijns P. Intestinal absorption enhancement of the ester prodrug tenofovir disoproxil fumarate through modulation of the biochemical barrier by defined ester mixtures. Drug Metab Dispos 2002, 30 (8): 924-30

van Zonneveld M, Honkoop P, Hansen BE, Niesters HG, Darwish Murad S, de Man RA, Schalm SW and Janssen HL. Long-term follow-up of alpha-interferon treatment of patients with chronic hepatitis B. Hepatology 2004, 39 (3): 804-10

Vander Borght S, Komuta M, Libbrecht L, Katoonizadeh A, Aerts R, Dymarkowski S, Verslype C, Nevens F and Roskams T. Expression of multidrug resistance-associated protein 1 in hepatocellular carcinoma is associated with a more aggressive tumour phenotype and may reflect a progenitor cell origin. Liver Int 2008, 28 (10): 1370-80

Varfolomeev E, Goncharov T, Maecker H, Zobel K, Komuves LG, Deshayes K and Vucic D. Cellular inhibitors of apoptosis are global regulators of NF-kappaB and MAPK activation by members of the TNF family of receptors. Sci Signal 2012, 5 (216): ra22

Venne A, Li S, Mandeville R, Kabanov A and Alakhov V. Hypersensitizing effect of pluronic L61 on cytotoxic activity, transport, and subcellular distribution of doxorubicin in multiple drug-resistant cells. Cancer Res 1996, 56 (16): 3626-9

Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H and Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. J Immunol Methods 1995, 184 (1): 39-51

Villanueva A and Llovet JM. Targeted therapies for hepatocellular carcinoma. Gastroenterology 2011, 140 (5): 1410-26

Villanueva A, Newell P, Chiang DY, Friedman SL and Llovet JM. Genomics and signaling pathways in hepatocellular carcinoma. Semin Liver Dis 2007, 27 (1): 55-76

Vlaming ML, Lagas JS and Schinkel AH. Physiological and pharmacological roles of ABCG2 (BCRP): recent findings in Abcg2 knockout mice. Adv Drug Deliv Rev 2009, 61 (1): 14-25

von Marschall Z, Scholz A, Cramer T, Schafer G, Schirner M, Oberg K, Wiedenmann B, Hocker M and Rosewicz S. Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. J Natl Cancer Inst 2003, 95 (6): 437-48

Vucic D, Dixit VM and Wertz IE. Ubiquitylation in apoptosis: a post-translational modification at the edge of life and death. Nat Rev Mol Cell Biol 2011, 12 (7): 439-52

Wada H, Nagano H, Yamamoto H, Arai I, Ota H, Nakamura M, Damdinsuren B, Noda T, Marubashi S, Miyamoto A, Takeda Y, Umeshita K, Doki Y, Dono K, Nakamori S, Sakon M and Monden M. Combination therapy of interferon-alpha and 5-fluorouracil inhibits tumor angiogenesis in human hepatocellular carcinoma cells by regulating vascular endothelial growth factor and angiopoietins. Oncol Rep 2007, 18 (4): 801-9

Wakabayashi K, Nakagawa H, Tamura A, Koshiba S, Hoshijima K, Komada M and Ishikawa T. Intramolecular disulfide bond is a critical check point determining degradative fates of ATP-binding cassette (ABC) transporter ABCG2 protein. J Biol Chem 2007, 282 (38): 27841-6

Wang X, Furukawa T, Nitanda T, Okamoto M, Sugimoto Y, Akiyama S and Baba M. Breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) induces cellular resistance to HIV-1 nucleoside reverse transcriptase inhibitors. Mol Pharmacol 2003, 63 (1): 65-72

Wang X, Nitanda T, Shi M, Okamoto M, Furukawa T, Sugimoto Y, Akiyama S and Baba M. Induction of cellular resistance to nucleoside reverse transcriptase inhibitors by the wild-type breast cancer resistance protein. Biochem Pharmacol 2004, 68 (7): 1363-70

Wang T, Zhao R, Wu Y, Kong D, Zhang L, Wu D, Li C, Zhang C, Yu Z and Jin X. Hepatitis B virus induces G1 phase arrest by regulating cell cycle genes in HepG2.2.15 cells. Virol J 2011, 8: 231

Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB and Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. Science 2001, 292 (5517): 727-30

Whittaker S, Marais R and Zhu AX. The role of signaling pathways in the development and treatment of hepatocellular carcinoma. Oncogene 2010, 29 (36): 4989-5005

Winter RN, Kramer A, Borkowski A and Kyprianou N. Loss of caspase-1 and caspase-3 protein expression in human prostate cancer. Cancer Res 2001, 61 (3): 1227-32

World Health Organization (WHO). Hepatitis B. Fact sheet N° 204, 2012. WHO website: http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/

Wiedmann MW and Mossner J. Molecular targeted therapy of hepatocellular carcinoma - results of the first clinical studies. Curr Cancer Drug Targets 2011, 11 (6): 714-33

Wilson-Welder JH, Torres MP, Kipper MJ, Mallapragada SK, Wannemuehler MJ and Narasimhan B. Vaccine adjuvants: current challenges and future approaches. J Pharm Sci 2009, 98 (4): 1278-316

Xu J, Liu H, Chen L, Wang S, Zhou L, Yun X, Sun L, Wen Y and Gu J. Hepatitis B virus X protein confers resistance of hepatoma cells to anoikis by up-regulating and activating p21-activated kinase 1. Gastroenterology 2012, 143 (1): 199-212 e4

Yang YF, Zhao W, Zhong YD, Yang YJ, Sheng L, Zhang N and Huang P. Comparison of the efficacy of thymosin alpha-1 and interferon alpha in the treatment of chronic hepatitis B: a meta-analysis. Antiviral Res 2008, 77 (2): 136-41

Yang JD and Roberts LR. Hepatocellular carcinoma: A global view. Nat Rev Gastroenterol Hepatol 2010, 7 (8): 448-58

Yang CH and Cho M. Hepatitis B virus X gene differentially modulates cell cycle progression and apoptotic protein expression in hepatocyte versus hepatoma cell lines. J Viral Hepat 2012, 20 (1): 50-8

Ye L, Dong N, Wang Q, Xu Z, Cai N, Wang H and Zhang X. Progressive changes in hepatoma cells stably transfected with hepatitis B virus X gene. Intervirology 2008, 51 (1): 50-8

Ye L, Qi J, Li G, Tao D and Song S. The effect of HBx gene on the apoptosis of hepatic cells. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci 2007, 27 (2): 167-9

Yeh CT, Shen CH, Tai DI, Chu CM and Liaw YF. Identification and characterization of a prevalent hepatitis B virus X protein mutant in Taiwanese patients with hepatocellular carcinoma. Oncogene 2000, 19 (46): 5213-20

Yeh TS, Chen TC and Chen MF. Dedifferentiation of human hepatocellular carcinoma up-regulates telomerase and Ki-67 expression. Arch Surg 2000, 135 (11): 1334-9

Yeo W, Mok TS, Zee B, Leung TW, Lai PB, Lau WY, Koh J, Mo FK, Yu SC, Chan AT, Hui P, Ma B, Lam KC, Ho WM, Wong HT, Tang A and Johnson PJ. A randomized phase III study of doxorubicin versus cisplatin/interferon alpha-2b/doxorubicin/fluorouracil (PIAF) combination chemotherapy for unresectable hepatocellular carcinoma. J Natl Cancer Inst 2005, 97 (20): 1532-8

Yoh K, Ishii G, Yokose T, Minegishi Y, Tsuta K, Goto K, Nishiwaki Y, Kodama T, Suga M and Ochiai A. Breast cancer resistance protein impacts clinical outcome in platinum-based chemotherapy for advanced non-small cell lung cancer. Clin Cancer Res 2004, 10 (5): 1691-7

Yoo BJ, Selby MJ, Choe J, Suh BS, Choi SH, Joh JS, Nuovo GJ, Lee HS, Houghton M and Han JH. Transfection of a differentiated human hepatoma cell line (Huh7) with in vitro-transcribed hepatitis C virus (HCV) RNA and establishment of a long-term culture persistently infected with HCV. J Virol 1995, 69 (1): 32-8

Yu Y and Little JB. p53 is involved in but not required for ionizing radiation-induced caspase-3 activation and apoptosis in human lymphoblast cell lines. Cancer Res 1998, 58 (19): 4277-81

Yuen MF and Lai CL. Treatment of chronic hepatitis B: Evolution over two decades. J Gastroenterol Hepatol 2011, 26 Suppl 1 138-43}

Yuen MF, Seto WK, Fung J, Wong DK, Yuen JC and Lai CL. Three years of continuous entecavir therapy in treatment-naive chronic hepatitis B patients: VIRAL suppression, viral resistance, and clinical safety. Am J Gastroenterol 2011, 106 (7): 1264-71

Zaman GJ, Flens MJ, van Leusden MR, de Haas M, Mulder HS, Lankelma J, Pinedo HM, Scheper RJ, Baas F, Broxterman HJ and et al. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. Proc Natl Acad Sci U S A 1994, 91 (19): 8822-6

Zanetti AR, Van Damme P and Shouval D. The global impact of vaccination against hepatitis B: a historical overview. Vaccine 2008, 26 (49): 6266-73

Zastre JA, Chan GN, Ronaldson PT, Ramaswamy M, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Bendayan M and Bendayan R. Up-regulation of P-glycoprotein by HIV protease inhibitors in a human brain microvessel endothelial cell line. J Neurosci Res 2009, 87 (4): 1023-36

Zhang X, Dong N, Zhang H, You J, Wang H and Ye L. Effects of hepatitis B virus X protein on human telomerase reverse transcriptase expression and activity in hepatoma cells. J Lab Clin Med 2005, 145 (2): 98-104

Zhang WY, Cai N, Ye LH and Zhang XD. Transformation of human liver L-O2 cells mediated by stable HBx transfection. Acta Pharmacol Sin 2009, 30 (8): 1153-61

Zheng L, Liang P, Zhou J, Huang X, Wen Y, Wang Z and Li J. BC047440 antisense eukaryotic expression vectors inhibited HepG2 cell proliferation and suppressed xenograft tumorigenicity. Braz J Med Biol Res 2012, 45 (2): 97-103

Zhu AX. Systemic therapy of advanced hepatocellular carcinoma: how hopeful should we be? Oncologist 2006, 11 (7): 790-800

Zhu AX. Development of sorafenib and other molecularly targeted agents in hepatocellular carcinoma. Cancer 2008, 112 (2): 250-9

Zoulim F and Perrillo R. Hepatitis B: reflections on the current approach to antiviral therapy. J Hepatol 2008, 48 Suppl 1 S2-19