

Universidad de Barcelona
Facultad de Farmacia
Departamento de Fisicoquímica

Consejo Superior de Investigaciones Científicas
Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona
Departamento de Química de Péptidos y Proteínas

Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer
Hospital Clínico de Barcelona
Servicio de Inmunología

Programa de doctorado "Medicaments, alimentació i salut"
Bienio: 2000-2002

Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV)

Memoria presentada por M^a Teresa Pérez Escoda para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Directores:

Dra. Isabel Haro Villar
Investigador Científico
Dept. Química de Péptidos y Proteínas
IIQAB - CSIC

Dra. Guadalupe Ercilla González
Consultor
Servicio de Inmunología
IDIBAPS - Hospital Clínico

Tutor:

Dra. Montserrat Muñoz
Profesora asociada
Departamento de Fisicoquímica
Facultad de Farmacia
Universidad de Barcelona

M^a Teresa Pérez Escoda
Barcelona, marzo 2007

*A mi familia,
por estar siempre*

Que vértigo, como pasa el tiempo, si parece que fue ayer cuando llegué al laboratorio de “péptidos” y han pasado ya unos cuantos años. Durante todo este tiempo he conocido a personas que de una manera u otra y sin saberlo, han influido en mi desarrollo profesional y personal. Es por esto que esta tesis es para mí mucho más que conocimientos y resultados. Han sido muchas personas, tanto de dentro como de fuera del laboratorio, sin las cuales no hubiera podido llegar hasta aquí, por eso, esta tesis es un poquito de todos. Quiero agradecerlos que hayáis estado a mi lado todo este tiempo.

Mi primer y más sincero agradecimiento es para las Dras. Isabel Haro y Guadalupe Ercilla, directoras de esta tesis, por su dedicación generosa, su confianza en mis cualidades y el apoyo recibido durante todo este tiempo. Quisiera agradecerles también el tiempo invertido en enseñarme y aconsejarme a lo largo de estos años, y por darme la oportunidad de entrar en el mundo de la investigación.

A la Dra. M^a Asunción Alsina y a mi tutora, la Dra. Montserrat Muñoz, del Departamento de Físicoquímica de la Facultad de Farmacia por su disponibilidad y ayuda siempre que la he necesitado.

Quiero dar las gracias a la gente del Servicio de Inmunología del Hospital Clínico, especialmente a Isabel, con cuya ayuda he podido contar siempre que la he requerido. A Sonia del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Bellvitge por hacerme sentir como en mi propio laboratorio. A la Dra. Pepita Casas, del estabulario, quiero agradecerle su ayuda en los experimentos con animales de laboratorio. Al Dr. Francisco Sánchez su ayuda en los experimentos de infrarrojos. A la Dra. Montse Cruz por explicarme el funcionamiento del Peakfit.

Gracias también a la Dra. Aurora Casanovas, del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de Bellvitge, al Instituto de Hemodiálisis de Barcelona, y a la Unidad de Hepatología del Hospital Clínico por cedernos las muestras de sueros con las que se han realizado los estudios.

Gracias al Dr. Weng Chan y a toda la gente de su laboratorio por acogerme durante mi estancia en su laboratorio en la Universidad de Nottingham.

Gracias al CSIC por la concesión de las becas de postgrado y predoctoral del programa I3P, financiadas por el Fondo Social Europeo de las que he podido disfrutar durante el desarrollo de esta tesis doctoral.

Por supuesto, gracias a todos los compañeros de “batalla”, a los de ahora y a los que ya no trabajan en el Departamento de Química de Péptidos y Proteínas. Empiezo por dar las gracias a Núria Rojo, que me inició en la síntesis de péptidos, a Silvia y a Cristina por su compañerismo dentro del laboratorio y por la amistad demostrada fuera de él. Por ese montón de cenas compartidas y que espero que sigamos haciendo. A Marisa, uff... recuerdo perfectamente el día que llegaste, tu sólo venías a presentarte y al final aguantaste mi rollo sobre la síntesis de péptidos. Desde ese día hemos compartido muchas horas sintetizando y purificando, peleándonos con los ELISA y hasta hemos

tenido alguna que otra riña. Gracias por aguantarme y por animarme. Por ser mi amiga, por los viajes, las cervezas y las confianzas compartidas. Tú serás la siguiente en leer la tesis, ¡ánimo!

Gracias también a Jordi con quien era una placer discutir sobre dicroísmo o cualquier otra cuestión, científica o no. Gracias a María Cubero, a Devi y a Titi.

Gracias a Elena, a pesar de que hace menos tiempo que nos conocemos, también hemos compartido muy buenos momentos. Quiero agradecerte el estar siempre disponible, tu sentido del humor y tu capacidad para hacerme ver que las cosas no hay que complicarlas tanto. No quiero olvidarme de M^º José, por ayudarme con su experiencia en el tramo final de mi tesis. Ni tampoco del resto de compañeros del laboratorio, Mónica, Maria, Nacho, Alfonso y Jessi, por su compañerismo y las risas compartidas a la hora del café.

Debo también un agradecimiento a Laura, a Núria Almiñana y a Ana con las que compartí poyata los primeros años en el laboratorio, porque hicieron posible que el lugar de trabajo fuera una fuente inagotable de buenas experiencias. Un gràcies carregat de carinyo a l'Ana, tot i que la nostra amistat va iniciar-se al laboratori, va saber sobrepassar les seves parets i amb els anys s'ha fet gran amb nosaltres; gràcies pel teu alè, pel teu diàleg, per aguantar-me, per animar-me, pel temps que hem "perdut" plegades i *por los días que vendrán...* per tantes coses...

No podría faltar un agradecimiento especial a M^º Carmen y a Emili, por haber compartido con humor estos años de trabajo; y un sincero y enorme gracias a Mari, que siempre me ha prestado su ayuda con cariño, por sus amables y alentadoras palabras.

Gràcies a les de sempre, les "immaculades": l'Eva, l'Eulàlia, l'Eli, la Mariona, la Marta i la Coscu, per acompanyar-me des que ens vam conèixer al pati de l'escola, fa ja 25 anys! A la gente de la facultad, por las noches de vino y rosas, por esas huidas. Als companys de l'APB, per poder compartir junts una de les meves grans aficions i per preocupar-se sempre per mi, la meva tesi i les meves cabòries.

Y por último, pero no por ello menos importante, quiero dar las gracias a mi familia que también ha puesto su grano de arena y me ha apoyado incondicionalmente.

¡GRACIAS A TODOS!

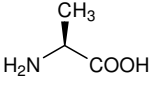
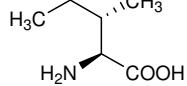
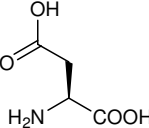
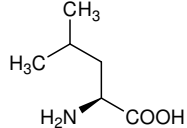
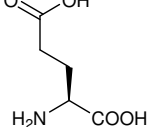
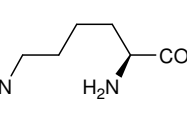
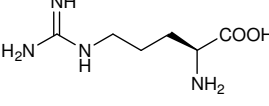
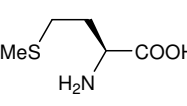
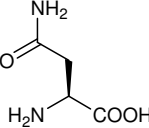
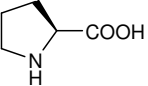
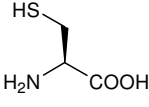
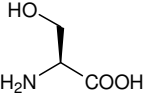
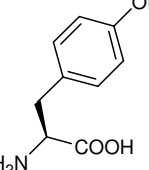
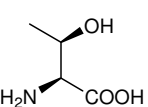
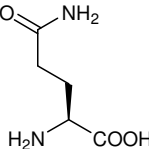
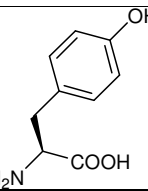
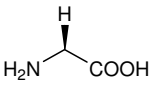
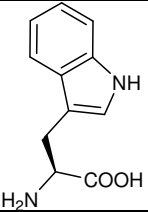
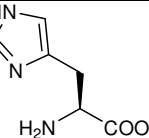
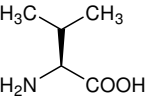
Abreviaturas, acrónimos y símbolos

θ	elipticidad molar
λ	longitud de onda
ε	coeficiente de extinción molar
A	absorbancia
Aa	aminoácido
Ac	anticuerpo
Ac ₂ O	anhídrido acético
ACF	adyuvante completo de Freund
AcOH	ácido acético
Ag	antígeno
AIF	adyuvante incompleto de Freund
ARN	ácido ribonucleico
AUC	área bajo la curva, del inglés <i>area under curve</i>
BIA	análisis de interacción bioespecífico, del inglés <i>biospecific interaction analysis</i>
Boc	tert-butoxicarbonil
BSA	albúmina bovina sérica, del inglés <i>bovine seric albumin</i>
CD	dicroísmo circular, del inglés <i>circular dichroism</i>
CMD	carboximetildextrano
CO	valor del punto de corte, del inglés <i>cut-off</i>
DBU	1,8-diazabicyclo-[5,4,0]-undec-7-ene
DCM	diclorometano
DIEA	N,N-diisopropiletilamina
DIPCDI	N,N'-diisopropilcarbodiimida
Dmab	4{N-[1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)-3-metilbutil]-amino}benciloxi
DMAP	N,N-dimetilaminopiridina
DMF	N-N'-dimetilformamida
DMSO	dimetilsulfóxido
EDC	1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida
EDT	1,2-etanoditiol
ELISA	ensayo inmunoenzimático en fase sólida, del inglés <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EM	espectrometría de masas
Fmoc	9-fluorometoxicarbonil
FT-IR	espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier, del inglés <i>Fourier transform infrared spectroscopy</i>
GBV-C/HGV	GB virus C / virus de la hepatitis G

HAV	virus de la hepatitis A
HBS-EP	tampón Hepes salino-EDTA surfactante P, del inglés <i>Hepes buffered saline</i>
HBV	virus de la hepatitis B
HCV	virus de la hepatitis C
Hepes	ácido N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-etanosulfónico)
HFIP	1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol
HIV	virus de la inmunodeficiencia humana
HMPA	ácido 4-hidroximetilfenoxiacético
HOAt	1-hidroxi-7-azabenzotriazol
HOBt	1-Hidroxibenzotriazol
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución
IFC	cartucho integrado de microfluidos, del inglés <i>integrated microfluidic cartridge</i>
Ig	inmunoglobulina
IgG	inmunoglobulina G
ivDde	1-(4,4-dimetil-2,6-dioxociclohexiliden)3-metilbutilo
MALDI-TOF	del inglés <i>matrix-assisted laser desorption-ionization time of flight</i>
MAP	péptido multiantigénico, del inglés <i>multiple antigen peptide</i>
MeCN	acetonitrilo
MeOH	metanol
NMP	N-metilpirrolidona
NOS	N-hidroxisuccinimida
NS	no estructural, del inglés <i>non-structural</i>
OPD	orto-fenilendiamina
PBS	tampón fosfato salino, del inglés <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	reacción en cadena de la polimerasa, del inglés <i>polimerase chain reaction</i>
Pmc	2,2,5,7,8-pentametilcroman-6-sulfonio
PyBOP	hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin)fosfonio
ROC	curva de rendimiento diagnóstico, del inglés <i>receiver operating characteristic</i>
RU	unidades de resonancia
SPPS	síntesis de péptidos en fase sólida, del inglés <i>solid-phase peptide synthesis</i>
SPR	resonancia del plasmón de superficie, del inglés <i>surface plasmon resonance</i>
Sulfo-NHS	sulfo-N-hidroxisuccinimida
T	temperatura
TBTU	tetrafluoroborato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]-N-metilmetanaminio
tBu	tert-butil
TFA	ácido trifluoroacético
TFE	2,2,2-trifluoroetanol

TIS	triisopropilsilano
TRIS	tris(hidroximetil)-aminometano
Trt	trifenilmetil
UV	ultravioleta

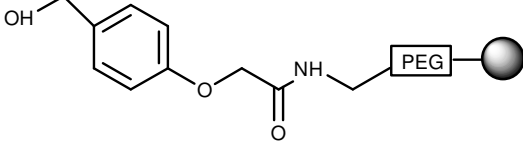
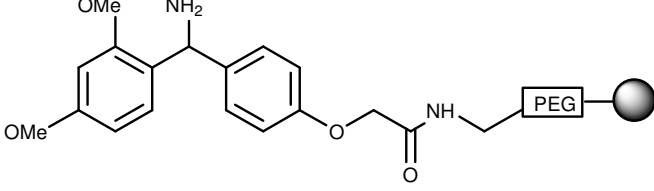
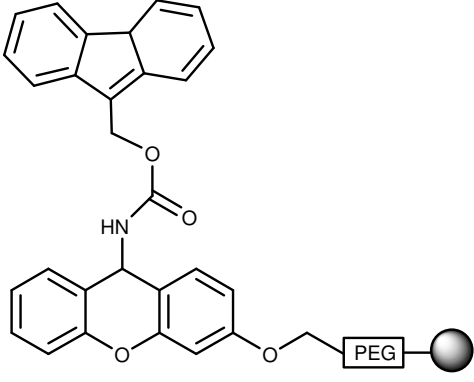
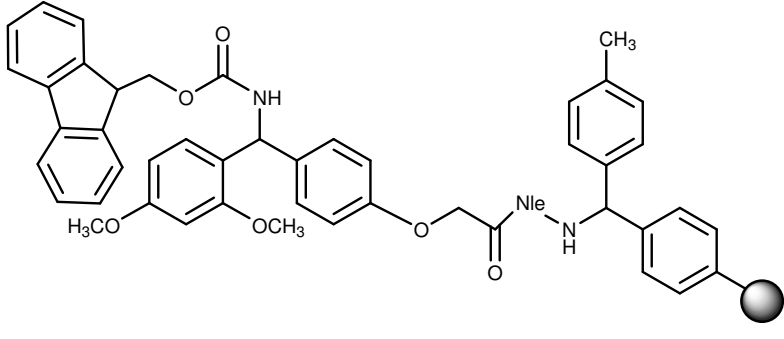
Anexo 1: Aminoácidos, código de tres letras, una letra y estructura

aminoácido	estructura	aminoácido	estructura
Alanina, Ala, A		Isoleucina, Ile, I	
Ácido aspártico, Asp, D		Leucina, Leu, L	
Ácido glutámico, Glu, E		Lisina, Lys, K	
Arginina, Arg, R		Metionina, Met, M	
Asparagina, Asn, N		Prolina, Pro, P	
Cisteína, Cys, C		Serina, Ser, S	
Fenilalanina, Phe, F		Treonina, Thr, T	
Glutamina, Gln, Q		Tirosina, Tyr, Y	
Glicina, Gly, G		Triptófano, Trp, W	
Histidina, His, H		Valina, Val, V	

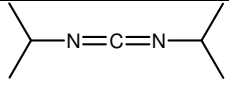
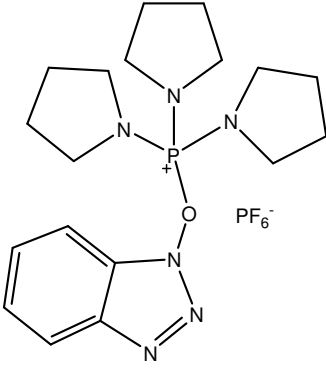
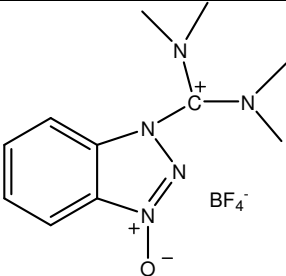
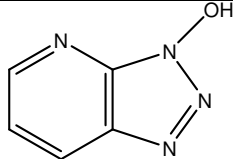
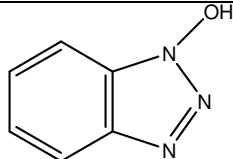
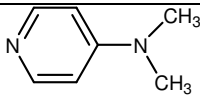
Anexo 2: Grupos protectores empleados en la estrategia Fmoc/tBu

protector	aminoácido	estructura
Pmc	Arginina, Arg, R	
Trt	Asparagina, Asn, N Cisteína, Cys, C Glutamina, Gln, Q Histidina, His, H	
tBu	Ácido aspártico, Asp, D Ácido glutámico, Glu, E Serina, Ser, S Tirosina, Tyr, Y Treonina, Thr, T	
Boc	Lisina, Lys, K Triptófano, Trp, W	
ivDde	Lisina, Lys, K	
Dmab	Ácido aspártico, Asp, D	



Anexo 3: Soportes sólidos utilizados en la síntesis de péptidos en fase sólida

nombre	estructura
Resina NovaSyn® TGA	
Resina NovaSyn® TGR	
Resina NovaSyn® TG Sieber	
Resina Rink Amida MBHA	

Anexo 4: Agentes de condensación y aditivos empleados en la síntesis de péptidos en fase sólida

nombre	abreviación	estructura
N,N'-diisopropilcarbodiimida	DIPCDI	
Hexafluorofosfato de benzotriazol-1-il-N-oxi-tris(pirrolidin) fosfonio	PyBOP	
Tetrafluoroborato de N-óxido de N-[(1H-benzotriazol-1-il)-dimetilamino-metilen]-N-metilmetanaminio	TBTU	
1-hidroxi-7-azabenzotriazol	HOAt	
1-hidroxibenzotriazol	HOBt	
N,N-dimetilaminopiridina	DMAP	

Anexo 5: secuencia primaria de las construcciones peptídicas sintetizadas en esta tesis

nombre	secuencia
NS4a(27-43)	H-TDWDVKGGGSPLYRHGD-OH
NS4b(8-22)	H-GESAPSDAKTVTDAVD-OH
NS5a(112-126)	H-GTSGWAEVVVTPTHVD-OH
Qm1	H-GTSGWAEVVVTPTHVD-GGG-GESAPSDAKTVTDAVD-OH
Qm2	H-GESAPSDAKTVTDAVD-GGG-GTSGWAEVVVTPTHVD-OH
cyc-HT	
cyc-CT	H-TDWDVKGGGSPLYRHGD 
región E2 (89-149)	<pre> P1 SVSVTCVWGSVSWFA P2 SVTCVWGSVSWFAST P3 TCVWGSVSWFASTGG P4 VWGSVSWFASTGGRD P5 GSVSWFASTGGRDSK P6 VSWFASTGGRDSKID P7 WFASTGGRDSKIDVW P8 ASTGGRDSKIDVWSL P9 TGGGRDSKIDVWSLVP P10 GRDSKIDVWSLVPVG P11 DSKIDVWSLVPVGS P12 KIDVWSLVPVGSASC P13 DVWSLVPVGSASCTI P14 WSLVPVGSASCTIAA P15 LVPVGSASCTIAALG P16 PVGSASCTIAALGSS P17 GSASCTIAALGSSDR P18 ASCTIAALGSSDRDT P19 CTIAALGSSDRDTV P20 IALGSSDRDTVVEL P21 ALGSSDRDTVVELSE P22 GSSDRDTVVELSEWG P23 SDRDTVVELSEWGP P24 RDTVVELSEWGPVPCA </pre>
MAP ₄ E2-NS5a	<pre> H-VSWFASTGGRDSKIDVWSLV—K— H-GTSGWAEVVVTPTHV—K— H-VSWFASTGGRDSKIDVWSLV—K—K—β-A-NH₂ H-GTSGWAEVVVTPTHV—K— </pre>

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCIÓN	
I. El virus de la hepatitis G	27
II. Respuesta inmunitaria a virus	32
OBJETIVOS	37
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
CAPÍTULO 1	
Péptidos sintéticos como antígenos. Diseño, síntesis y purificación de construcciones peptídicas pertenecientes a proteínas estructurales y no estructurales del virus GBV-C/HGV	
1.1 Diagnóstico de infecciones víricas	45
1.2 Selección de las secuencias peptídicas	47
1.3 Síntesis de péptidos en fase sólida	50
1.3.1 Síntesis, purificación y caracterización del péptido NS4b(8-22)	56
1.3.2 Síntesis, purificación y caracterización del péptido NS5a(112-126)	57
1.3.3 Síntesis, caracterización y purificación de los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2	59
1.3.4 Síntesis de péptidos superpuestos. Región estructural E2(89-149)	62
1.3.5 Síntesis, purificación y caracterización del péptido ramificado MAP ₄ E2-NS5a	64
1.3.6 Ciclación de péptidos en fase sólida	68
1.3.6.1 Selección y diseño de los péptidos cíclicos	70
1.3.6.2 Síntesis y caracterización del precursor lineal NS4a(23-47)	71
1.3.6.3 Síntesis, caracterización y purificación de los péptidos cíclicos cyc-CT y cyc-HT	74
1.4 Recapitulación	78
CAPÍTULO 2	
Diseño de un ensayo inmunoenzimático basado en péptidos sintéticos con aplicación al diagnóstico de la infección por GBV-C/HGV	
2.1 El ensayo inmunoenzimático: ELISA	83
2.1.1 ELISA indirecto	84

	Página
2.2 Optimización del ensayo inmunoenzimático	84
2.2.1 Unión covalente de los péptidos a las microplacas	84
2.2.1.1 Unión por formación de un enlace entre la superficie de la placa y las funciones amino de los péptidos	87
2.2.1.2 Unión por formación de un enlace entre la superficie de la placa y las funciones ácido carboxílico de los péptidos	89
2.2.2 Efecto de la concentración de péptido unido a placa	91
2.2.3 Efecto de la dilución de los sueros	92
2.3 Estudio de la capacidad antigénica de las construcciones sintéticas	93
2.3.1 Comparación de las reactividades en ELISA de los péptidos NS4b(8-22) y NS5a(112-126) del virus GBV-C/HGV y sus construcciones quiméricas lineales Qm1 y Qm2	95
2.3.2 Comparación de las reactividades en ELISA del péptido NS4a(27-43) del virus GBV-C/HGV y sus construcciones cíclicas cyc-HT y cyc-CT	98
2.3.3 Estudio de la reactividad en ELISA de los péptidos superpuestos de la región 89-149 de la proteína de estructura E2 del virus GBV-C/HGV	101
2.3.4 Comparación de las reactividades en ELISA de los péptidos E2(99-118) y NS5a(112-126) del virus GBV-C/HGV y su construcción peptídica ramificada tetramérica MAP ₄ E2-NS5a	102
2.4 Curvas de rendimiento diagnóstico	105
2.4.1 Comparación de la capacidad diagnóstica de las secuencias sintéticas	106
2.5 Comparación de la capacidad para detectar anticuerpos anti-GBV-C/HGV de las secuencias sintéticas versus la proteína recombinante E2	112
2.6 Detección de anticuerpos anti-GBV-C/HGV en sueros de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)	115
2.7 Recapitulación	122

CAPÍTULO 3

Estudios conformacionales de las construcciones sintéticas

3.1 Dicroísmo circular	127
3.1.1 Expresión del dicroísmo circular	128
3.1.1.1 Espectros de CD de estructuras secundarias de proteínas ...	129
3.1.1.2 Estructura secundaria de péptidos y proteínas	130

	Página
3.1.2 Estudio conformacional de los péptidos NS4b(8-22), NS5(112-126), Qm1 y Qm2	134
3.1.2.1 Ensayo en medio acuoso	134
3.1.2.2 Ensayo en presencia de disolventes fluorados	135
3.1.3 Estudio conformacional de los péptidos NS4a(27-43), cyc-HT y cyc-CT	140
3.1.3.1 Influencia de los disolventes fluorados	141
3.2 Espectroscopia de infrarrojo	143
3.2.1 Asignación de bandas	144
3.2.1.1 Deconvolución de los espectros IR	146
3.2.2 Estudio comparativo de los péptidos quiméricos Qm1 y Qm2	146
3.3 Recapitulación	148

CAPÍTULO 4

Análisis de interacciones bioespecíficas en tiempo real.

Tecnología de resonancia de plasmón de superficie

4.1 Introducción a la técnica de resonancia del plasmón de superficie	153
4.2 Inmovilización de las secuencias NS4b(8-22), NS5a(112-126), Qm1 y Qm2 sobre la superficie del chip CM5	156
4.2.1 Detección de anticuerpos anti-GBV-C/HGV mediante la técnica de resonancia del plasmón de superficie utilizando los péptidos sintéticos NS4b(8-22), NS5a(112-126) y las construcciones quiméricas Qm1 y Qm2	161
4.2.2 Comparación de las técnicas de ELISA y SPR	165
4.3 Inmovilización de la secuencia MAP ₄ E2-NS5a sobre la superficie del chip CM5	166
4.3.1 Detección de anticuerpos anti-GBV-C/HGV mediante la técnica de resonancia del plasmón de superficie utilizando la construcción multiepitópica ramificada MAP ₄ E2-NS5a	169
4.4 Recapitulación	171

CAPÍTULO 5

Estudio de la capacidad inmunogénica de construcciones peptídicas

5.1 Introducción. Utilización de los péptidos sintéticos como inmunógenos	175
5.2 Obtención de los derivados hidrófobos	176

	Página
5.2.1 Derivatización hidrófoba de los péptidos NS4b(8-22), NS5a(112-126), Qm1, Qm2 y E2(99-118)	177
5.3 Análisis de la respuesta humoral secundaria mediante el ensayo de ELISA ..	178
5.4 Análisis de la respuesta humoral secundaria mediante la técnica de resonancia de plasmón de superficie	182
5.4.1 Formación de las monocapas de los lipopéptidos Palm ₂ -K-Qm1 y Palm ₂ -K-Qm2	185
5.4.2 Análisis de las muestras de sueros	186
5.5 Recapitulación	188
 CONCLUSIONES	 191
 MATERIALES Y MÉTODOS	
6. Reactivos, disolventes e instrumentación general	
6.1 Reactivos y disolventes	195
6.2 Instrumentación general	196
 7. Síntesis de péptidos en fase sólida	
7.1 Consideraciones generales de la síntesis	197
7.2 Tests de identificación	198
7.2.1 Test cualitativo de Kaiser o ninhidrina	198
7.2.2 Test de cloranilo	198
7.2.3 Test de De Clercq o del p-nitrofeniléster	199
7.3 Síntesis de péptidos en fase sólida	199
7.3.1 Incorporación del primer aminoácido. Formación del anhídrido simétrico	199
7.3.2 Determinación del grado de unión del primer aminoácido	200
7.3.3 Eliminación del grupo Fmoc	201
7.3.4 Incorporación de los aminoácidos	202
7.3.5 Acetilación	203
7.3.6 Eliminación de los grupos protectores ivDde y Dmab	203
7.3.7 Tratamiento final y secado de la peptidil-resina	204
7.3.8 Liberación del péptido de la resina y eliminación de los grupos protectores de las cadenas laterales de los aminoácidos	205
7.4 Síntesis semiautomática de péptidos	205

	Página
7.5 Derivatización hidrófoba: obtención de los derivados di-palmitoil	207
7.6 Purificación de los péptidos	208
7.7 Caracterización y cuantificación de los péptidos	208
7.7.1 Espectrometría de masas	208
7.7.2 Análisis de aminoácidos	208
8. Ensayo inmunoenzimático: ELISA	
8.1 Disoluciones tamponadas	209
8.2 Sueros	210
8.3 Protocolo de ELISA no competitivo	210
8.3.1 Unión de los péptidos a las placas de microensayo	210
8.3.1.1 Unión a través de los grupos amino del péptido. Microplacas Covalink NH™	210
8.3.1.2 Unión a través de los grupos carboxilo del péptido. Microplacas Covalink NH™	211
8.3.1.3 Unión a través de los grupos amino del péptido. Microplacas DNA-Bind™	211
8.3.2 Bloqueo de los lugares no saturados	212
8.3.3 Reacción con el inmunoreactivo soluble	212
8.3.4 Lavados	212
8.3.5 Reacción con el conjugado enzimático	212
8.3.6 Adición del sustrato enzimático	213
8.3.7 Protocolo de ELISA para el análisis de las muestras de suero infectadas por el HIV	214
8.4 Control de los ensayos	214
8.5 Estimación del punto de corte	214
8.6 Tratamiento estadístico de los datos	215
8.7 Protocolo de ELISA indirecto para el análisis de las muestras de suero de ratón	215
8.7.1 Adsorción de los péptidos a las microplacas	215
8.7.2 Bloqueo de los lugares no saturados	216
8.7.3 Reacción con el inmunoreactivo soluble	216
8.7.4 Reacción con el conjugado enzimático	216
8.7.5 Adición del sustrato enzimático	216

9. Dicroísmo circular y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier	
9.1 Instrumentación	217
9.2 Dicroísmo circular	217
9.2.1 Condiciones experimentales	217
9.2.2 Preparación de las muestras	217
9.2.3 Procesado de los espectros	218
9.3 Espectroscopia de de infrarrojo	218
9.3.1 Condiciones experimentales	218
9.3.2 Preparación de las muestras	218
9.3.3 Procesado de los espectros	219
10. Tecnología de resonancia del plasmón de superficie	
10.1 Instrumentación	219
10.1.1 Chips sensores	221
10.2 Unión covalente de los péptidos al chip sensor CM5. Formación de enlaces amida	222
10.2.1 Preparación de las muestras	222
10.2.2 Protocolo de unión	223
10.2.3 Análisis de los sueros	223
10.3 Adsorción de los lipopéptidos al chip sensor HPA	224
10.3.1 Preparación de las muestras	224
10.3.2 Formación de las monocapas	224
10.3.3 Análisis de los sueros	225
11. Inmunización: producción de anticuerpos policlonales	
11.1 Protocolo de inmunización	225
11.2 Obtención de las muestras de suero	226
BIBLIOGRAFÍA	227
TRABAJOS RELACIONADOS	243

INTRODUCCIÓN

Los virólogos han obtenido notables avances en el entendimiento de las hepatitis de origen infeccioso en los últimos 20 años; no obstante, aún continúan apareciendo casos de enfermedad hepática difíciles de resolver, lo cual constituye un desafío para los investigadores quienes mantienen la búsqueda de nuevos agentes infecciosos. Hasta la fecha, los científicos vinculan al menos catorce virus a la inflamación hepática, ya sea directa o indirectamente; cinco de los cuales son capaces de causar hepatitis aguda en el hombre [1]. Los virus de la hepatitis A, B, C, D y E están todos bien caracterizados y definidos molecularmente, y su asociación a esta enfermedad ha quedado inequívocamente establecida. Sin embargo, la clasificación de un agente como virus de la hepatitis F, no ha sido todavía suficientemente documentada [2].

I. El virus de la hepatitis G

La historia de la hepatitis G comienza en la década de los sesenta cuando un cirujano de Chicago con iniciales GB contrajo una hepatitis aguda de origen desconocido. Más de tres décadas después, en 1995, se publicó el descubrimiento de dos virus asociados a la hepatitis, los cuales fueron aislados tomando como punto de partida el suero de GB. Estos agentes recibieron los nombres de virus A de la hepatitis GB (GBV-A) y virus B de la hepatitis GB (GBV-B) [3,4]. Pronto se supo que GBV-A y GBV-B eran agentes endógenos de los tamarinos (*Saguinus spp*), utilizados como animales de experimentación [5]. Más tarde, un tercer virus estrechamente relacionado con los anteriores, nombrado virus C de la hepatitis GB (GBV-C) se aisló en pacientes con hepatitis no A-no E, individuos consumidores de drogas por vía endovenosa y en donantes de sangre voluntarios en África, Canadá y Estados Unidos [6,7].

Paralelamente, otro grupo de investigadores había revelado haber aislado un nuevo virus al que ellos llamaron virus de la hepatitis G (HGV, del inglés *hepatitis G virus*) y del cual apareció un informe completo un año más tarde [8].

Estudios realizados en diferentes laboratorios de investigación compararon los virus GBV-C y HGV y observaron que poseen más de un 95% de homología en la secuencia de aminoácidos, y aproximadamente un 85% de homología en la secuencia de nucleótidos, lo que permitió llegar a la conclusión de que se trata del mismo virus [9]. Teniendo en consideración estos datos, en esta tesis se referirá a este agente como GBV-C/HGV.

I.A Análisis filogenético

El análisis filogenético de 40 secuencias genómicas de GBV-C/HGV revela la existencia de al menos seis genotipos distintos. Los genotipos se encuentran muy distribuidos geográficamente, y el tiempo pronosticado de divergencia es paralelo a la divergencia de las razas humanas, lo que sugiere que se trata de un virus antiguo [10].

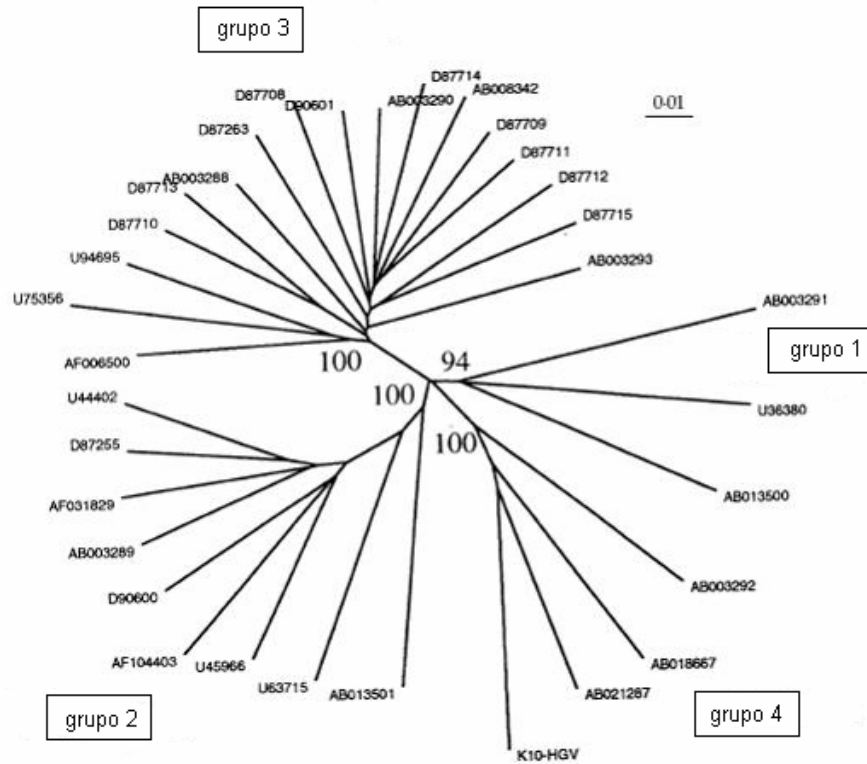


Figura 1. Árbol filogenético donde se muestran los diferentes genotipos descritos del virus GBV-C/HGV [10].

Inicialmente se describieron tres genotipos del virus originarios de África (genotipo 1) [11], América del Norte y Europa (genotipo 2), y Japón (genotipo 3). El número de genotipos se expandió para incluir las nuevas cepas diferenciadas aisladas en Myanmar y Vietnam [12], y en Sudáfrica [13]. Así pues, un cuarto genotipo incluye las cepas aisladas en el sudeste asiático mientras que el genotipo 5 lo constituyen las cepas aisladas en Sudáfrica. Esta propuesta de clasificación fue validada por Smith y colaboradores [10] que demostraron la correlación de los cinco genotipos tras analizar una pequeña región del gen E2. Recientemente, un estudio realizado por Muerhoff [14], en el que se analizan las regiones 5'-UTR de las cepas aisladas hasta el momento, sugiere la existencia de un sexto genotipo, en el que se incluyen las secuencias aisladas en la población de Indonesia.

I.B Caracterización molecular

El GBV-C/HGV es un virus perteneciente a la familia *Flaviviridae* de tipo ARN de cadena sencilla y polaridad positiva. Su genoma consta aproximadamente de 9.400 nucleótidos que codifican para una única poliproteína de alrededor de 2.900 aminoácidos. En el extremo amino de esta poliproteína se encuentran las proteínas de envoltura E1 y E2, mientras que las no estructurales NS2, NS3, NS4 y NS5 se encuentran en el extremo carboxilo de la poliproteína.

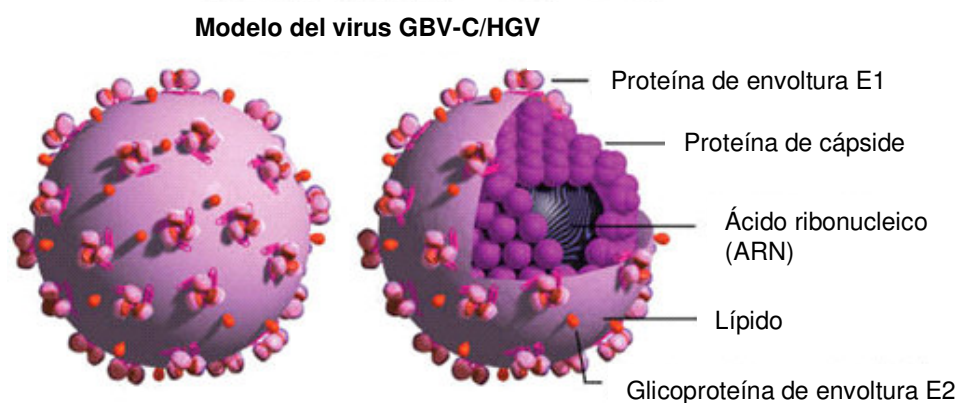


Figura 2. Modelo de la estructura del virus GBV-C/HGV. Fuente: www.prn.org.

La organización genómica del virus GBV-C/HGV es similar al virus de la hepatitis C con el que presenta una homología cercana al 29%. Las funciones biológicas de cada una de las proteínas del virus todavía no se conocen con exactitud, aunque los estudios realizados sugieren que la región E2 codifica para una glicoproteína localizada en la superficie del virus [15]. Una de las diferencias más notables con el virus de la hepatitis C es la ausencia de una proteína que codifique para un *core* o nucleocápside, sin embargo, la caracterización microscópica y biofísica de partículas del virus en plasma sugieren la existencia de dicha estructura [16]. La organización de las proteínas no estructurales es muy similar a la del virus de la hepatitis C. Se sabe que las regiones NS2 y NS3 codifican para proteasas [17] y que la región NS3 codifica además para una helicasa [18]. La proteína NS4a actúa como cofactor de la helicasa [19] mientras todavía se desconoce el papel que desempeña la proteína NS4b. En cuanto a las proteínas NS5, existen estudios que sugieren que la región *a* está involucrada con la sensibilidad a interferón, tratamiento útil para eliminar la infección por GBV-C/HGV [20], y que la región *b* codifica para una polimerasa dependiente de ARN.

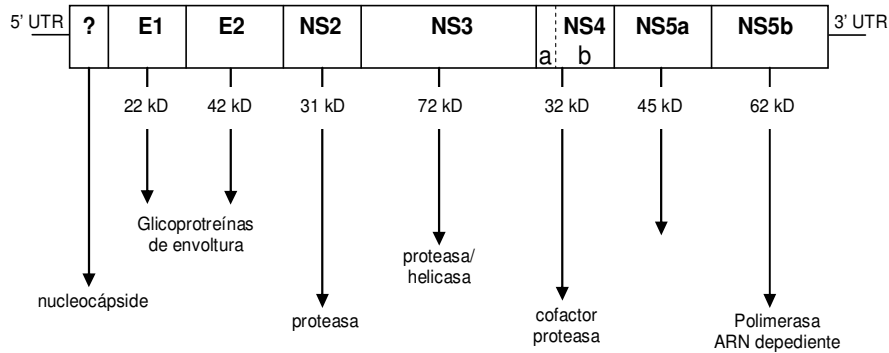


Figura 3. El genoma del virus GBV-C/HGV codifica para proteínas de envoltura (E1 y E2) y proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4 y NS5).

I.C Prevalencia y transmisión

La infección por GBV-C/HGV es muy común. La viremia por GBV-C/HGV se define como la detección en suero de material genético del agente. La detección del ARN viral se realiza por sistemas de amplificación de ácidos nucleicos como la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La prevalencia de la infección por GBV-C/HGV depende del perfil de grupo estudiado. Entre el 1 y el 4% de la población general tiene niveles detectables de ARN GBV-C/HGV [21,22,23], pero este porcentaje se incrementa hasta el 37% en la población de riesgo, donde quedan incluidos drogadictos, personas que han recibido transfusiones o que están en programas de hemodiálisis. La transmisión a través de la sangre y sus derivados está bien documentada [24,25,26,27,28], a pesar que también se ha descrito la transmisión sexual [29,30] y vertical [31,32]. La coinfección con los virus de la hepatitis B y C es muy común (20%) [33,34,35], y entre un 35-40% de los individuos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV, del inglés *human immunodeficiency virus*) también presentan coinfección con el GBV-C/HGV [36,37].

I.D Manifestaciones clínicas

La infección por GBV-C/HGV puede persistir durante muchos años sin ninguna evidencia de sintomatología clínica o enfermedad, tanto en personas inmunocompetentes como en individuos inmunodeprimidos. Por otro lado, algunos autores le han atribuido al virus casos de enfermedad hepática crónica y hepatitis severas [38,39]. Sin embargo, estudios posteriores de viremia por GBV-C/HGV y casos de hepatitis agudas o crónicas no han podido demostrar que exista una asociación

entre GBV-C/HGV y el proceso patológico [40,41]. Al contrario de lo que ocurre con la infección por el virus de la hepatitis C, existe muy poca correlación entre los niveles de transaminasa glutámico-pirúvica y la presencia de ARN en suero [33].

Lo más probable es que la severidad del cuadro clínico en alguno de los pacientes guarde relación con las deficiencias inmunológicas originadas por su enfermedad de base, ya que muchos de ellos son pacientes sometidos a regímenes politransfusionales por problemas oncohematológicos, pacientes hemodializados y con antecedentes de tratamiento con fármacos inmunosupresores o esteroides [42]. Debido a estas observaciones no se puede concluir que este agente sea responsable de la producción de hepatitis aguda o crónica, por lo que resulta difícil discernir si el virus GBV-C/HGV, cuando se encuentra en un paciente con hepatitis no A-no E o cirrosis criptogenética, es la causa de la enfermedad, o meramente un espectador inocente en un proceso causado por un agente no A-no G o algún cuadro no viral.

I.E Diagnóstico

Los métodos para la detección de la presencia del virus GBV-C/HGV en el suero, por tanto de infección activa, están basados en la amplificación de secuencias del genoma del virus mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Posteriormente, se ensayó la expresión de proteínas estructurales en sistemas de expresión eucariota, generalmente regiones de la proteína de envoltura E2. Dos laboratorios distintos lograron desarrollar un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para la detección de anticuerpos dirigidos contra la proteína recombinante E2 expresada en células de mamífero [43]. Sin embargo, cabe destacar, que en la actualidad no están disponibles en el mercado. Empleando ambos marcadores de exposición al GBV-C/HGV, la presencia de ARN viral como indicativo de infección activa y la seroconversión anti-E2 como marcador de infección pasada, se comprobó que la prevalencia de la infección por GBV-C/HGV era mayor que la estimada únicamente por la detección de ARN viral, lo que indica que una gran parte de la población ha estado expuesta al virus [44,45].

A pesar que la aparición de anticuerpos anti-E2 se considera un indicativo de infección pasada y que difícilmente son concomitantes la detección de anticuerpos y la presencia de ARN viral, existen trabajos en los que son detectables en suero simultáneamente anticuerpos anti-E2 y material genético del virus [46]. Sin embargo, también se han encontrado casos de personas expuestas al virus y que no han desarrollado anticuerpos contra la proteína E2 [37]. En estos casos podrían haberse desarrollado anticuerpos dirigidos contra otras proteínas distintas a la de envoltura E2, como podrían ser las proteínas no estructurales.

I.F GBV-C/HGV y HIV

Debido a que los dos virus comparten las mismas vías de transmisión, la coinfección GBV-C/HGV y HIV es muy común. Hasta un 39% de los individuos positivos para el HIV pueden presentar infección activa por GBV-C/HGV y otro 47% presenta anticuerpos anti-E2 [47]. La viremia de GBV-C/HGV en estos individuos está asociada con una disminución en la mortalidad, una progresión más lenta hacia el desarrollo del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) y una mayor supervivencia de los enfermos una vez ya han desarrollado el SIDA [48,35,49]. Por otro lado, la pérdida de GBV-C/HGV, especialmente sin desarrollar anticuerpos anti-E2 conduce a un acelerado avance de la infección por HIV [50,51]. Esto sugiere que es importante conocer el estado de la infección por GBV-C/HGV en estos pacientes y si se han desarrollado o no anticuerpos contra GBV-C/HGV. Los estudios realizados hasta el momento apuntan a que existe un mecanismo múltiple por el que la infección de GBV-C/HGV mejora la progresión de la enfermedad relacionada con el HIV. Parece ser que existe un efecto inhibitorio directo de GBV-C/HGV en la replicación del HIV, y que este efecto está asociado al mantenimiento de un perfil de expresión de citoquinas tipo Th-1 que inhibe la replicación del HIV en los pacientes coinfectados [34]. También es posible que GBV-C/HGV emplee efectos indirectos en la progresión de la infección por HIV, alterando la respuesta inmunológica hacia HIV de manera beneficiosa [52]. Son necesarios muchos más estudios para entender exactamente cual es el papel que desempeña el virus GBV-C/HGV en la infección por HIV.

II. Respuesta inmunitaria a virus

El principal objetivo del sistema inmunológico es asegurar que las infecciones y el crecimiento de células no deseadas está controlado. Esta función requiere un sofisticado entramado que asegure la correcta activación y desactivación de respuestas específicas para que la tarea se realice de modo satisfactorio sin producir ninguna lesión inapropiada al huésped. Una inmunidad efectiva requiere la activación coordinada tanto de la respuesta inmunitaria innata como de la adaptativa.

Los virus son parásitos intracelulares estrictos, es decir, necesitan la maquinaria bioquímica de las células del huésped para llevar a cabo la síntesis proteica y metabolizar los azúcares. Una vez han penetrado en el organismo, los virus se unen a las células huésped a través de receptores específicos lo cual determina el tropismo viral hacia un determinado huésped o tipo de célula. Una vez el virus entra en la célula se deshace de su cubierta, su ácido nucleico queda libre y se produce la transcripción y la subsiguiente síntesis de proteínas víricas. El genoma vírico se replica y las nuevas partículas se ensamblan y son liberadas para que infecten a otras células y tejidos adyacentes (Figura 4).

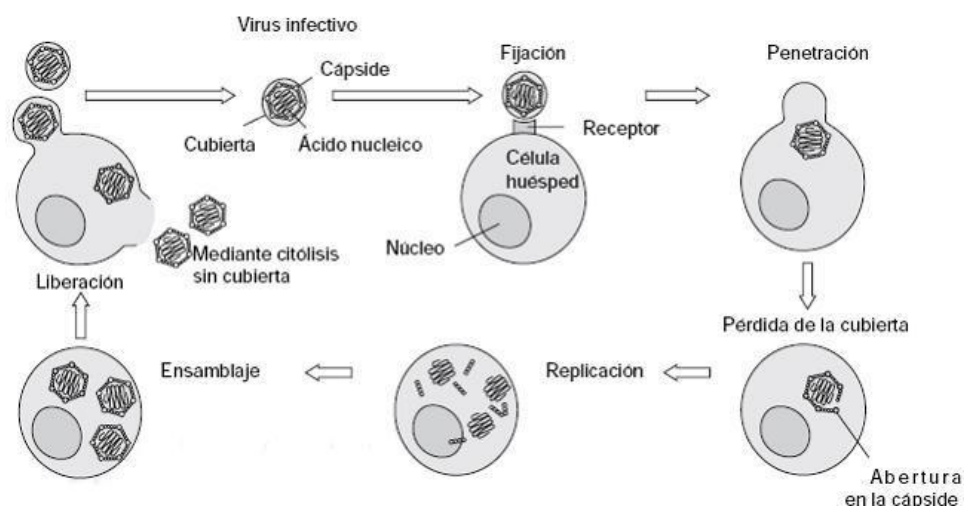


Figura 4. Ciclo general de replicación de los virus.

Estas invasiones por agentes patógenos son inicialmente combatidas por mecanismos de defensa innata, como son las células NK (del inglés *natural killer*), los interferones y otras citoquinas, que actúan en los primeros minutos de la infección.

Los virus ARN son potentes inductores de síntesis de interferones que activan los mecanismos antivíricos de las células próximas y aumentan su resistencia frente a la infección vírica. Incrementan la presentación de antígenos en todas las células y activan las células NK. Las células NK son linfocitos especializados capaces de reconocer y eliminar rápidamente, y sin una activación previa, las células infectadas por patógenos [53,54]. Las células NK reconocen dianas que expresan niveles reducidos o anormales de complejo mayor de histocompatibilidad de clase I (MHC I) [55], y/o proteínas inducidas por estrés [56]. A diferencia de los linfocitos T citotóxicos, las células NK no precisan un reconocimiento de antígeno específico para eliminar sus dianas.

Cuando la defensa innata del huésped es sobrepasada o evadida se induce la activación de la respuesta inmune adaptativa, en la que participan las células T citotóxicas y los anticuerpos que enlazan la respuesta adaptativa con la innata al actuar en la citotoxicidad mediada por células y dependiente de anticuerpos, e incluso entonces los mismos mecanismos que operan en la inmunidad innata son activados para eliminar el patógeno.

Los linfocitos T citotóxicos reconocen antígenos virales citosólicos asociados a moléculas MHC I, sin embargo, también requieren la producción de citoquinas por los linfocitos T colaboradores expresados sobre las células infectadas [57]. Los efectos antivirales de los linfocitos T citotóxicos se

deben a la lisis de las células infectadas, a la introducción de enzimas dentro de las células infectadas y a la secreción de citoquinas con actividad de interferón.

Los anticuerpos antivirales o **inmunoglobulinas** (Ig) constituyen una de las principales barreras para evitar la transmisión de virus entre las células y los tejidos. Se pueden generar inmunoglobulinas frente a cualquier proteína vírica que se encuentre en la célula infectada. Las inmunoglobulinas funcionan como la parte específica del complejo de las células B, a nivel de membrana, que reconoce al antígeno; y también como moléculas circulantes, es decir, anticuerpos secretados por las células plasmáticas procedentes de la activación, proliferación y diferenciación de células B. Estos anticuerpos se localizan en el suero, en los líquidos tisulares (intersticiales) y recubriendo ciertos epitelios internos.

II.A Epítopos

Los determinantes antigénicos o epítopos son cada uno de los sitios discretos de una macromolécula que son reconocidos individualmente por un anticuerpo específico. Según esto, hay que pensar en los antígenos como estructuras complejas que suelen constar de varios tipos de epítopos, cada uno de ellos capaz de unirse con un anticuerpo específico diferente.

Cuando se trate de antígenos proteicos, la unión de éste con el anticuerpo seguramente implicará varios niveles de estructura, desde la primaria a la terciaria, e incluso, en algunos casos la cuaternaria. El tamaño de un epítipo depende del tamaño del sitio de unión que posea el anticuerpo o inmunoglobulina específica respectiva. Los epítopos de células B de proteínas nativas suelen consistir en varios aminoácidos hidrófilos de la superficie de la proteína, y son los que están más accesibles al anticuerpo libre.

Estos epítopos se clasifican habitualmente como continuos o discontinuos, dependiendo de si los aminoácidos incluidos en el epítipo son continuos o no en la secuencia primaria de la proteína. El nombre de **epítipo continuo** se da a un fragmento corto y lineal capaz de unirse con el anticuerpo como si se tratase de la proteína entera; suelen depender de regiones en forma de bucle, situadas entre cadenas α consecutivas.

Generalmente, está aceptado que la mayoría de epítopos en las proteínas son **epítopos discontinuos** o conformacionales, es decir, constituidos por residuos que no necesariamente son contiguos en la secuencia de aminoácidos, pero que presentan proximidad espacial debido al plegamiento de la proteína. Si se desnaturaliza una proteína, se perderán los epítopos conformacionales pero permanecerán los epítopos continuos (Figura 5).

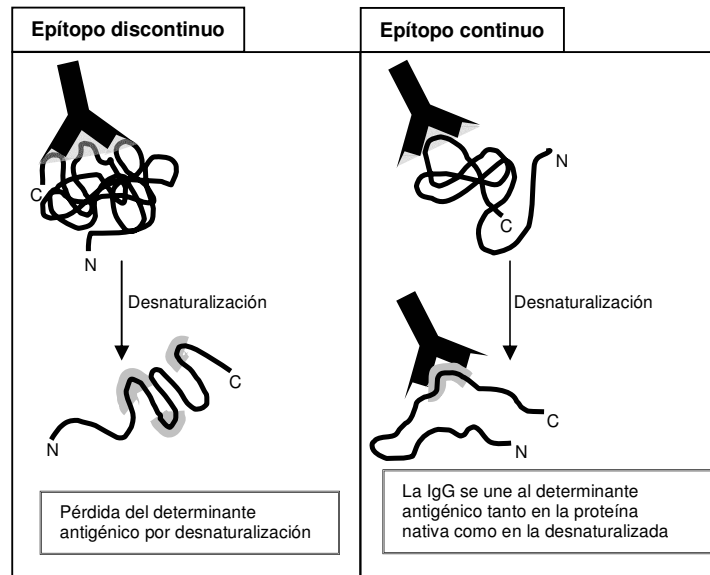


Figura 5. Tipos de epítomos. Epítomos continuos y epítomos discontinuos.

La mayor parte de la superficie de una proteína globular es potencialmente antigénica, y consiste en numerosos epítomos parcialmente superpuestos. Ahora bien, dada una determinada proteína, no todos los epítomos son igualmente inmunogénicos para distintos individuos de la misma especie. Para cada individuo y para cada antígeno suele existir un epítomo llamado inmunodominante.

OBJETIVOS

El objetivo global en que se enmarca este proyecto es el diseño y posterior desarrollo de un sistema de diagnóstico basado en péptidos sintéticos que permita la detección de la infección causada por el virus GBV-C/HGV.

El objetivo principal de la presente tesis doctoral es estudiar la capacidad de distintas construcciones peptídicas sintéticas para reconocer anticuerpos dirigidos contra proteínas del virus GVB-C/HGV.

Los objetivos concretos que se persiguen para la consecución del objetivo principal son los siguientes:

1. Diseñar construcciones peptídicas pertenecientes al virus GBV-C/HGV como posibles secuencias antigénicamente relevantes del virus para el desarrollo de un ensayo inmunoenzimático basado en péptidos. Aunque el trabajo se basará mayoritariamente en estudiar la capacidad antigénica de las proteínas no estructurales, se considerará también en el estudio la proteína de envoltura E2.
2. Sintetizar, purificar y caracterizar las secuencias diseñadas. Para ello, se llevarán a cabo las síntesis de los péptidos tanto de forma manual como semiautomática. La caracterización de las moléculas obtenidas se realizará empleando las técnicas habituales en química de péptidos como son el análisis de aminoácidos, la cromatografía líquida de alta resolución y la espectrometría de masas.
3. Diseñar un ensayo inmunoenzimático, basado en péptidos sintéticos, que pueda ser utilizado como prueba serodiagnóstica para la detección de anticuerpos específicos contra el virus GBV-C/HGV.
4. Realizar un estudio conformacional de las secuencias más relevantes mediante dicroísmo circular y espectroscopia de infrarrojo por transformada de Fourier para tratar de correlacionar la capacidad antigénica y la estructura secundaria de los péptidos.
5. Investigar la aplicación de un instrumento biosensor comercial, basado en la resonancia del plasmón de superficie, en la detección de anticuerpos específicos y determinar su posible aplicación en el diagnóstico de la infección por GBV-C/HGV.

Además de estudiar el carácter antigénico de secuencias relacionadas con el virus GBV-C/HGV, se planteó estudiar la capacidad de las construcciones antigénicas para estimular el sistema inmunitario. Por ello, se marcó un nuevo objetivo dentro de este proyecto que consiste en analizar la

respuesta inmunológica de las construcciones sintéticas en animales de experimentación y, al mismo tiempo, estudiar la eficacia de los lipopéptidos como agentes inmunogénicos.