

# Comparación de la antigenicidad de un péptido sintético y una proteína recombinante de la región de transmembrana (gp 36) del VIH-2

**Milenen Hernández Marin, Lilliam Pozo Peña,\* Martha Amat Arenas,\* Chryslaine Rodríguez Tanty\*\* y David Higginson Clarke.\*\***

Laboratorio de Síntesis de Péptidos, \*Laboratorio de Retrovirus, Centro de Inmunoensayo, Calle 134 y Avenida 25, Reparto Cubanacán, Apartado Postal 6945, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Correo electrónico: iqpeptidos@cie.sld.cu \*\*Laboratorio de Biología Molecular, Centro de Neurociencias de Cuba.

Recibido: 15 de agosto de 2007. Aceptado: 22 de diciembre de 2008.

Palabras clave: péptido sintético, proteína recombinante, gp36, antigenicidad, VIH-2.  
Key words: synthetic peptide, recombinant protein, gp36, antigenicity, HIV-2.

**RESUMEN.** El virus de la inmunodeficiencia humana del tipo 2 (VIH-2) se detectó en países de África Occidental y es otro agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El gen env codifica la síntesis de la proteína precursora, gp140, que es procesada por una proteasa del virus en dos proteínas: gp36 y gp105. Los péptidos sintéticos y proteínas recombinantes de la glicoproteína de la transmembrana gp36 muestran una elevada reactividad y especificidad en la detección de anticuerpos en muestras de pacientes infectados, por lo que son ampliamente utilizadas en el inmunodiagnóstico del VIH-2. En el presente trabajo se evaluó la reactividad de un péptido sintético gp36 (5) (585-610) y la proteína recombinante gp36 de la región de la transmembrana del VIH-2, frente a 15 muestras positivas al VIH-2. La especificidad de estos antígenos se evaluó con 74 muestras de seropositivos cubanos al VIH-1 y 30 sueros de donantes de un banco de sangre. Se utilizó como ensayo de referencia el UMELISA HIV 1+2 Recombinant (TecnoSUMA Internacional S.A., Cuba), para la detección de anticuerpos contra el VIH 1 y 2. Todas las muestras utilizadas en el estudio fueron confirmadas por el ensayo de *Western Blot*. Se obtuvo un 100 % de reactividad para los dos antígenos. El péptido sintético gp36 (5) no detectó las muestras positivas del VIH-1 evaluadas, a diferencia de la proteína recombinante que detectó un 46 % de estas muestras. La especificidad de los dos antígenos fue de un 100 % frente a las muestras de donantes sanos de un banco de sangre. Este estudio demostró la gran reactividad de la proteína recombinante y el péptido sintético, así como la elevada especificidad de este último frente a muestras positivas al VIH-2.

**ABSTRACT.** The human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) was detected in countries of Western Africa and it is another cause of the Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). The env gene encodes the synthesis of the precursor gp140 protein that is cleaved by the virus protease into two proteins: gp36 and gp105. The synthetic peptides and recombinant proteins of the transmembrane gp36 glycoprotein show a high reactivity and specificity in the detection of antibodies in samples of infected patients, for what they are broadly used in the HIV-2 immunodiagnosis. In the present work the reactivity of a synthetic peptide gp36 (5) (585-610) and the recombinant protein gp36 from transmembrane region of HIV-2 were tested with 15 positive samples of HIV-2. In order to assess specificity of those antigens, 74 sera from seropositive Cuban people to HIV-1 and 30 samples from healthy blood donors were tested. UMELISA HIV 1+2 Recombinant assay (TecnoSUMA Internacional S.A., Cuba) was used as a reference for the detection of antibodies to HIV 1 and 2. All the samples used in the study were confirmed by Western Blot assay. Sensitivity for both antigens was 100 %. The synthetic peptide gp36 (5) didn't detect the positive samples of the HIV-1 evaluated, contrary to the recombinant protein that detected 46 % of the samples. Specificity for both antigens was 100 % with the samples from healthy blood donors. This study demonstrated the high reactivity of the recombinant protein and the synthetic peptide, and the high specificity of this last one with HIV-2 positive samples.

## INTRODUCCIÓN

El virus de la Inmunodeficiencia Humana del tipo 2 (VIH-2) se detectó en 1986, en países de África Occidental y es otro agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).<sup>1</sup> La infección por el VIH-2 está poco extendida más allá del área endémica africana y de los inmigrantes procedentes de otros países. Sin embargo, en la actualidad existen evidencias de infecciones en sujetos nativos de Europa, Sudamérica, Estados Unidos, Asia y Australia.<sup>2</sup>

El espectro de manifestaciones clínicas asociadas a la infección VIH es muy heterogéneo, aunque algunas son debidas directamente al propio virus y la mayoría, se relaciona con las infecciones oportunistas<sup>3</sup> o neoplasias<sup>4</sup> que desarrollan estos pacientes.

La determinación del VIH-2 resulta actualmente un factor de gran importancia epidemiológica, lo que determina la inclusión de regiones inmunodominantes de ambos virus en los estuches de diagnóstico que permitan una identificación y

clasificación inequívoca de las personas infectadas por el VIH.<sup>5</sup>

El desarrollo del procedimiento técnico de la detección de antígenos y anticuerpos al VIH-1 y 2 se ha basado fundamentalmente en el desarrollo de los ensayos Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).<sup>6</sup> Estas pruebas pueden proporcionar excelentes resultados en la estrategia de diagnóstico en general.

Los resultados positivos en las pruebas de detección de anticuerpos (ELISA) y la trascendencia de la infección por el VIH hace necesaria la confirmación de los resultados. La técnica más ampliamente utilizada es el Western Blot (WB) por su gran sensibilidad y especificidad.<sup>7,8</sup> El WB contiene antígenos del VIH-1 y existen además, sistemas que incorporan en un extremo un péptido sintético específico al VIH-2. Así, se determina el diagnóstico del VIH-2 y se esclarecen los resultados indeterminados por WB para el VIH-1.

Se ha descrito que péptidos sintéticos de la glicoproteína de la transmembrana gp36 del VIH-2 muestran una elevada antigenicidad y especificidad en la detección de anticuerpos en sueros de pacientes infectados con VIH-2. Se sabe que en dicha proteína existen epítotos inmunodominantes lineales cercanos a la región N-terminal de la glicoproteína.<sup>9-11</sup> Por la razón antes expuesta, el objetivo del presente trabajo fue evaluar la reactividad y especificidad de un péptido sintético correspondiente a la región inmunodominante (585-610) de la proteína gp36 del VIH-2, comparado con la proteína recombinante gp36, que contiene en su secuencia esta región.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Síntesis química en fase sólida, purificación y caracterización del péptido gp36 (5) del VIH-2

El péptido se obtuvo mediante síntesis química en fase sólida, empleando la estrategia Boc en bolsas de polipropileno.<sup>12,13</sup> Posteriormente, se purificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en fase reversa (RP-HPLC, Pharmacia, LKB)<sup>14</sup> en una columna RP18 (Pharmacia) (Sistema de gradiente A/B de 0 a 60 % B (A TFA 0,1 % (v/v) y acetonitrilo 2 % (v/v) en H<sub>2</sub>O; B TFA 0,05 % (v/v) en acetonitrilo).

La caracterización del péptido se realizó mediante Espectrometría de Masas MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption of Ions Time-of-Flight).<sup>15</sup> Los procedimientos anteriores fueron descritos por Hernández M. y cols.<sup>16</sup>

### Proteína recombinante gp36

La proteína recombinante gp36 que se utilizó en este estudio fue suministrada por Heber Biotec (La Habana, Cuba), obtenida en *E. coli*, con más del 95 % de pureza estimada por estándar SDS-PAGE y RP-HPLC analítico.

### Recubrimiento de las placas UltramicroElisa (UMELISA)

El péptido gp36 (5) y la proteína recombinante gp36 se diluyeron en disolución reguladora carbonato-bicarbonato, 0,05 mol/L; pH 9,6, hasta una concentración de 2 y 1,5 µg/mL respectivamente. Con estas disoluciones por separado, se recubrió la fase sólida empleada, placas de poliestireno con capacidad para 30 µL (placas UMELISA, Greiner Bio-One, Alemania), se añadió un volumen 15 µL / pocillo y se incubó durante 3 h a 37 °C. La fase sólida se lavó con una disolución amortiguadora de PBS-T (8 g de NaCl, 1,215 g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O; 0,2 g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 0,2 g de NaN<sub>3</sub>, 0,5 mL de Tween-20; para un volumen de 1 000 mL de agua destilada y pH de 7,3-7,5). A continuación, se bloqueó con una disolución de preservó (BSA al

1 % en PBS-Tween-20), durante toda la noche a temperatura ambiente. Las placas se conservaron a 4 °C, con una cubierta protectora, hasta el momento de su uso.

### Ensayo UltramicroELISA (UMELISA)

Las muestras a evaluar se diluyeron 1 : 20 en suero de carnero al 5 % en disolución amortiguadora Tris-HCl (15 mmol/L de Tris: pH 7,8 y 0,05 % Tween-20), y se incubaron 30 min a 37 °C en las placas de reacción. Después de lavar tres veces con una disolución amortiguadora Tris-HCl, con el objetivo de eliminar los componentes no fijados, se adicionó un conjugado anti-IgG humana en camero marcada con fosfatasa alcalina (Roche Diagnostics GmbH, Alemania). Se incubó nuevamente durante 30 min a 37 °C se realizó un nuevo lavado en las mismas condiciones, para eliminar el conjugado en exceso. Se añadió entonces el sustrato fluorogénico 4-metilumbeliferilfosfato (Koch Light Ltd. Haverhill, Suffolk, England) y se incubó durante 30 min a temperatura ambiente. La fluorescencia emitida fue medida en un fluorímetro de la serie SUMA® (PR-521, Centro de Inmunoensayo, Ciudad de La Habana). En todos los experimentos, se incluyó como control positivo una muestra confirmada como positiva al VIH y como control negativo una muestra negativa al virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), virus de la hepatitis C (HCV) y virus de la hepatitis B (HBsAg). Las muestras se analizaron por duplicado.

### Muestras de suero

Se estudiaron tres muestras del Panel PRZ203 y siete muestras del Panel PRZ204 (Boston Biomedica Inc.), confirmadas por el ensayo de Western Blot (WB). Para el Panel PRZ-203, se empleó el Western Blot Cambridge Biotech HIV 2 (Estados Unidos) y para el Panel PRZ-204, el Western Blot Genelabs Diagnostics HIV 2 (Estados Unidos), información enviada por el suministrador (Tabla 1). Además, se analizaron cinco muestras de seropositivos al VIH-2 procedentes del Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA, La Habana, Cuba) (Tabla 2). Para evaluar la especificidad del péptido sintético gp36(5) y la proteína recombinante gp36, se estudiaron 74 muestras de seropositivos cubanos al VIH-1 (Sanatorio de Santiago de las Vegas, La Habana, Cuba) y 30 muestras de donantes del Banco de Sangre de Marianao (La Habana, Cuba), negativas a VIH, HCV, HBsAg.

### Nivel de corte

Para la validación de los resultados, se utilizó un programa de computación para trabajo con estuches UMELISA y lectores PR de la Tecnología SUMA (Strips Reader Software SRS V. 8.0).<sup>17</sup>

El nivel de corte (NC) fue de 0,30 determinado a partir del estudio de 1 000 muestras de suero de donantes de banco de sangre y 20 muestras de sueros positivos al VIH-2, confirmados por WB.

El valor de relación (VR) se definió como:

$$VR = \frac{(Fi - BB)}{P - BB}$$

donde:

Fi Fluorescencia de la muestra.

BB Valor promedio del Blanco.

P Menor valor de fluorescencia de los duplicados del Control Positivo.

Todos los valores numéricos fueron la media de los duplicados, expresados como el valor de relación para

cada muestra respecto al nivel de corte (VR/NC). Las muestras fueron consideradas positivas cuando VR/NC  $\geq$  1.

### Tratamiento estadístico de los resultados

Se empleó la prueba t-student para muestras independientes para comparar la media de la fluorescencia de las muestras evaluadas con el péptido sintético gp36 (5) y la proteína recombinante gp36. Todos los resultados fueron procesados con el paquete de programas estadísticos Statistica 6.1 para Windows.

### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

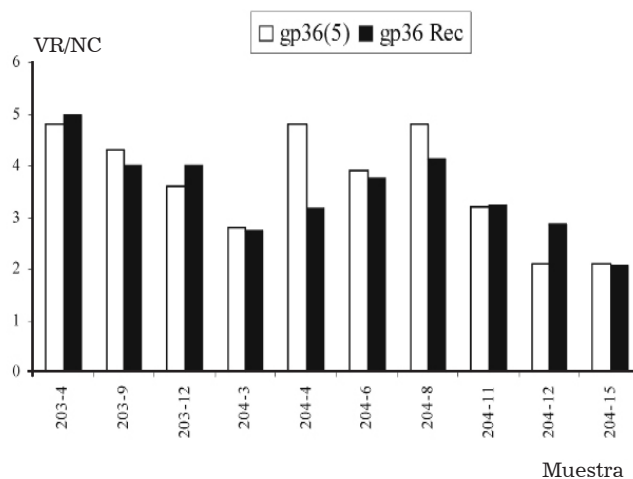
Se comparó la reactividad del péptido sintético gp36 (5) (585-610) con la proteína recombinante gp36, ambos antígenos representativos de la proteína gp36 de la región de la transmembrana del VIH-2. La secuencia del péptido sintetizado se correspondió con una región antigénica de la proteína gp36 del VIH-2, que fue seleccionada a partir del aislamiento ROD (Aislamiento de un paciente con SIDA del Oeste de África) Guyader y cols.<sup>18</sup>

La pureza del péptido fue comprobada por Cromatografía RP-HPLC y resultó del 96 %. Además, se caracterizó por Espectrometría de Masas MALDI-TOF, proceso en el que la masa molecular obtenida: 3 090,50 se correspondió con la calculada: 3 090,51.

El péptido sintético gp36 (5) y la proteína recombinante gp36 se evaluaron por separado frente a los Paneles PRZ-203 y PRZ-204 y con cinco muestras positivas al VIH-2 (LISIDA) respectivamente (Figuras 1 y 2).

Los resultados demostraron que la reactividad del péptido sintético gp36 (5) es similar a la de la proteína recombinante gp36. La gran reactividad de ambos antígenos frente a las muestras positivas al VIH-2 evaluadas se correspondió con los resultados que han sido reportados.<sup>9</sup>

Al realizar el análisis estadístico se comparó las medias de las dos muestras mediante la prueba t-student



**Fig. 1.** Reactividad del péptido sintético gp36 (5) y la proteína recombinante gp36 de la región de la transmembrana del VIH-2 frente a los Paneles PRZ-203 y PRZ-204 (Boston Biomedica Inc.).

**Tabla 1.** Características de la reactividad de las muestras positivas al VIH-2 de los paneles PRZ-203 y PRZ-204 (Boston Biomedica Inc.).

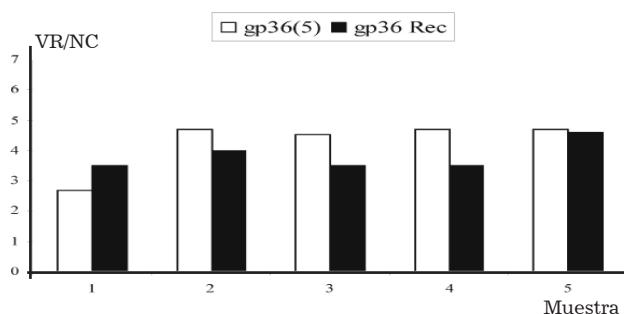
Muestra	Prueba confirmatoria <sup>1</sup>	Resultado
203-4	p15, p26, p31, p34, p55, p58, p65, gp105, gp120	Positivo
203-9	p15, p26, p31, p34, p55, p58, p68, gp105, gp120	Positivo
203-12	p15, p26, p31, p34, p55, p58, p68, gp105, gp120	Positivo
204-3	p26, gp36, p41, p53, p56, p68, gp80	Positivo
204-4	p24, p31, p51, p65, gp160	Positivo
204-6	p26, gp36, p41, p53, p56, p68, gp80, gp125	Positivo
204-8	p26, gp36, p41, p53, p56, p68, gp80, gp125	Positivo
204-11	p26, gp36, p41, p53, p56, p68, gp80	Positivo
204-12	p26, gp36, p41, p53, p56, p68, gp80, gp125	Positivo
204-15	p26, gp36, p53, p68, gp80	Positivo

p Proteína. Gp Glicoproteína. Positivo Una muestra que presenta reactividad, por la prueba confirmatoria, al menos a dos proteínas de la envoltura. <sup>1</sup> Resultados reportados por el suministrador.

**Tabla 2.** Características de la reactividad de las muestras positivas al VIH-2 procedentes del Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA).

Muestras	Prueba confirmatoria <sup>1</sup>	Resultado
1	p16, p26, p34, p36, p56, p68, gp105, gp140	Positivo
2	p16, gp36, p53, p55, p68, gp105, gp140	Positivo
3	gp36, p53, p56, p68, gp105, gp140	Positivo
4	p16, gp36, p53, p56, p68, gp105, gp140	Positivo
5	P16, p26, gp36, p53, p56, p68, gp105, gp140	Positivo

\_\_ Título bajo de anticuerpos a estas proteínas del VIH-2. Positivo: Una muestra que presenta reactividad, por la prueba confirmatoria, al menos a dos proteínas de la envoltura. P Proteína. Gp Glicoproteína. <sup>1</sup> Resultados reportados por el suministrador.



**Fig. 2.** Reactividad del péptido sintético gp36 (5) y la proteína recombinante gp36 de la región de la transmembrana del VIH-2 frente a muestras positivas al VIH-2 procedentes del Laboratorio de Investigaciones del SIDA (LISIDA).

para muestras independientes, se encontró que no existían diferencias significativas entre la media de la fluorescencia de las muestras evaluadas con el péptido sintético gp36 (5) y la proteína recombinante gp36 para un nivel de confianza del 95 %.

El péptido sintético gp36 (5) y la proteína recombinante gp36 se evaluaron por separado frente a 74 muestras de seropositivos cubanos al VIH-1 procedentes del Sanatorio de Santiago de las Vegas y 30 muestras de donantes sanos del Banco de Sangre de Marianao (Fig. 3). Las muestras fueron consideradas positivas cuando  $VR/NC \geq 1$ .

Se observó que el péptido sintético gp36 (5) no detectó las muestras positivas del VIH-1 evaluadas, a diferencia de la proteína recombinante gp36 que detectó un 46 %, lo que demuestra que esta última presenta reactividad cruzada frente a muestras del VIH tipo 1 (Fig. 3). Estos resultados se corresponden con lo reportado por Oldstone y cols.<sup>19</sup>

Estos investigadores determinaron que la proteína gp36 presenta reactividad cruzada frente a muestras positivas al VIH-1, debido a que existe una homología conformacional entre la proteína gp41, del VIH-1, y la gp36, la cual se debe a la formación en ambos casos de un lazo originado por la formación de un puente de disulfuro. Estos enlaces se obtienen por la oxidación de los grupos SH de las moléculas de cisteína en las secuencias CSGKLIC para la gp41 del VIH-1 y CAFRQVC para la gp36 del VIH-2.

El péptido sintético gp36 (5) y la proteína recombinante gp36 se evaluaron frente a muestras de suero de donantes sanos. Para los dos antígenos, los resultados fueron negativos, para las muestras analizadas se obtuvo un valor de relación o valor normado ( $VR/NC < 1$ ).

## CONCLUSIONES

Se comparó la antigenicidad de un péptido sintético y una proteína recombinante de la región de la transmembrana (gp36) del VIH-2, ambos de elevada reactividad frente a muestras positivas al VIH-2. El péptido sintético es muy específico frente a muestras positivas al VIH-2 a diferencia de la proteína recombinante que detectó el 46 % de reactividad frente a muestras positivas al VIH-1, lo que demostró reactividad cruzada con estas muestras. Ambos antígenos podrían resultar de gran utilidad para el inmunodiagnóstico del VIH-2.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Conant M.A. AIDS: a new disease. *Front. Radiat. Ther. Oncol.*, 19, 1, 1985.
2. Sullivan M.T., Guido E.A., Metler R.P., Schable C.A., Williams A.E and Stramer S.L. Identification and characterization of

an HIV-2 antibody-positive blood donor in the United States. *Transfusion*, 38, 189, 1998.

3. Kong B.N., Harwell J.I., Suos P., Lynen L., Mchiuddin S., Reinert S and Pugatch D. Opportunistic infections and HIV clinical disease stage among patients presenting for care in Phnom Penh, Cambodia. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health*, 38, 1, 2007.
4. Volkow P., Rubí S., Lizano M., Carrillo A., Vilar-Compte D., García-Carrancá A., Sotelo R., García B., Sierra-Madero J and Mohar A. High prevalence of oncogenic human papillomavirus in the genital tract of women with human immunodeficiency virus. *Gynecol. Oncol.*, 82, 27, 2001.
5. Martín D., Silva E., Pérez M.T., Fernández D., Romero K., Díaz H., Lubián A.L., Ruiz N., Ortiz E. Diseño y evaluación del sistema DAVIH VIH 2. *Rev. Cubana. Med. Trop.*, 59, 2007.
6. Manocha M., Chitralekha K.T., Thakar M., Shashikiran D., Paranjape R.S., Rao D.N. Comparing modified and plain peptide linked enzyme immunosorbent assay (ELISA) for detection of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) and type-2 (HIV-2) antibodies. *Immunol. Letters*, 85, 275, 2003.
7. Ravanshad M., Sabahi F., Mahboudi F., Kazemnejad A. Evaluation of a new dot blot assay for confirmation of human immunodeficiency virus type 1 and 2 infections using recombinant p24, gp41, gp120 and gp36 antigens. *Saudi. Med. J.*, 27, 31, 2006.
8. Lakshmi V., Ponangi S.P. Evaluation of an indigenous western blot kit for human immunodeficiency virus. *Indian. J. Med. Microbiol.*, 20, 200, 2002.
9. Alcaro M.C., Peroni E., Rovero P., Papini A. M. Synthetic peptides in the diagnosis of HIV infection. *Current. Prot. Pept. Sci.*, 4, 285, 2003.
10. Norrby E., Putkonen P., Böttiger B., Utter G and Bieberfeld G. Comparison of linear antigenic sites in the envelope proteins of Human Immunodeficiency Virus (HIV) type 2 and type 1. *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, 7, 279, 1991.
11. Trojnar J.Y., Wahren B., Rudén V., inventors; Ferring A.B. HIV peptides, artificial HIV antigens and immunoassay kits. PCT Patent. 1998.
12. Houghton R.A., DeGraw S.T., Bray M.K., Hoffmann S.R and Frizzell N.D. Simultaneous Multiple Peptide Synthesis: The rapid preparation of large numbers of discrete peptides for biological, immunological, and methodological studies. *BioTechniques*, 4, 522, 1986.
13. Merrifield R.B. Solid phase peptide synthesis: The synthesis of a tetrapeptide. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 2149, 1963.
14. Mant C.T., Kandejewski L.H., Cachia P.J., Monera O.D and Hodges R.S. Analysis of synthetic peptides by high performance liquid chromatography. *Methods Enzymol.*, 289, 426, 1997.
15. Gary Siuzdak. Mass spectrometry for biotechnology. Chapter 4. Peptide and Protein analysis by MALDI, First Edition, Academic Press, California, 81-86, 1996.
16. Hernández M., Pozo L., Gómez I., Melchor A. Antigenicidad de dos péptidos sintéticos de la región de transmembrana (gp41) del VIH-1 y su utilidad en el inmunodiagnóstico. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*, 32, 113, 2001.
17. Díaz W., Carlos N., Rego A. y Fernández J.L. Software para trabajo con estuches UMELISA y lectores PR de la tecnología SUMA (Strips Reader Software SRS Ver 8.0). Registro con número I 0010132021200 concedido por el Centro de Control Estatal de Equipos Médicos (CCEEM), 2001.
18. Guyader M., Emerman M., Sonigo P, Clavel F, Montagnier L. and Alizon M. Genome organization and transactivation of the human immunodeficiency virus type 2. *Nature*, 326, 662, 1987.
19. Oldstone M.B.A., Tishon A., Lewicki H., Dyson H.J., Fehrer V.A., Assa-Munt N., Wright P.E. Mapping the anatomy of the immunodominant domain of the Human Immunodeficiency Virus gp41 transmembrane protein: peptide conformation analysis using monoclonal antibodies and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J. Virol.*, 65, 1727, 1991.