

COMUNICACION CORTA

Evaluación de péptidos sintéticos representativos de proteínas del virus de la rubéola

Carmen Acosta Bas, Ileana Baluja Conde, Isis Amores Sánchez, Adys Brito Moreno, Milenen Hernández Marín,* Ivonne Gómez Cordero* y Mabel Montes de Oca.**

Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales, *Laboratorio de Síntesis de Péptidos y **Dpto de Bioterio, Centro de Inmunoensayo, Avenida 25 y 134, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 30 de junio de 1999. Aceptado: 24 de diciembre de 1999.

Palabras clave: rubéola, péptidos sintéticos, inmunogenicidad, antigenicidad.
Key words: rubella, synthetic peptides, immunogenicity, antigenicity.

La rubéola es un virus envuelto RNA de sentido positivo perteneciente a la familia *Togaviridae* y es el agente causal de una enfermedad exantemática. El virus de la rubéola contiene tres glicoproteínas estructurales: E1 y E2 embebidas en la membrana lipídica y una de la nucleocápside C que protege el RNA viral.^{1,2} Tanto la antigenicidad como la inmunogenicidad de estas proteínas han sido estudiadas empleando péptidos sintéticos obtenidos a partir de las predicciones de las secuencias.

En este trabajo se realizó la evaluación de la inmunogenicidad y antigenicidad de tres péptidos sintéticos: E16 (aa 1-29) de la proteína C, E17 (aa 211-237) de la proteína E1 y el E18 (aa 10-36) de la proteína E2 del virus de la rubéola.

La síntesis química en fase sólida se realizó según el procedimiento descrito por Merrifield en 1963, siguiendo la estrategia Boc en bolsas de polipropileno (Biotech Instruments, USA).³

La pureza de los péptidos fue analizada empleando un equipo de cromatografía líquida de alta resolución mediante cromatografía en fase reversa.

Para la preparación del inmunógeno se realizó la conjugación de los péptidos a BSA por el método del glutaraldehído en un paso.

Se emplearon ratones BALB/c de seis a ocho semanas (hembras) en un esquema de inmunización con 50 µg/mL de los péptidos conjugados a BSA los días 0, 21, y 42 del estudio.

En la primera inmunización, se empleó coadyuvante completo de Freund y en el resto de las reinmunizaciones, el incompleto.

En la determinación de la inmunogenicidad y antigenicidad, se empleó un ensayo de ultramicroELISA en el que las placas fueron recubiertas a razón de 1 mg/mL de cada péptido. Alternativamente, se utilizaron placas recubiertas con antígeno natural a dos unidades hemaglutinantes por mililitro.

Los tres péptidos empleados en la inmunización promovieron la producción de anticuerpos (Fig. 1).

Muchos han sido los estudios realizados empleando péptidos sintéticos representativos de las proteínas E1, E2 y C del virus de la rubéola.

En este trabajo, se pudo constatar la inmunogenicidad de estos péptidos, lo cual ha sido reportado por diferentes autores.

Wolinsky y colaboradores en 1991, realizaron un estudio empleando una batería de anticuerpos monoclonales para definir los epítomos lineales de las proteínas de la envoltura (E1, E2) y de la cápside (C), en el cual

lograron definir las secuencias siguientes:

E1 (a.a 202-283)

E2 (a.a 1-115)

C (a.a 9-29).⁴

La utilidad del empleo de proteínas recombinantes y péptidos sintéticos dio la posibilidad de deducir y aclarar la organización molecular de varios sitios antígenicos de las proteínas del virus de la rubéola.⁵

La respuesta obtenida por los ratones de la línea BALB/c inmunizados con péptidos representativos de las proteínas estructurales ha sido bien estudiada. Roberson y colaboradores en 1995, demostraron la capacidad de los anticuerpos generados contra péptidos, de reconocer las proteínas estructurales (naturales) de esta entidad infecciosa.⁶

Los resultados de este trabajo, sirven de soporte en la generación de nuevos anticuerpos monoclonales para su empleo en el desarrollo de ensayos tipo UMELISA con el principio de captura para la detección de anticuerpos IgM específicos al virus de la rubéola.

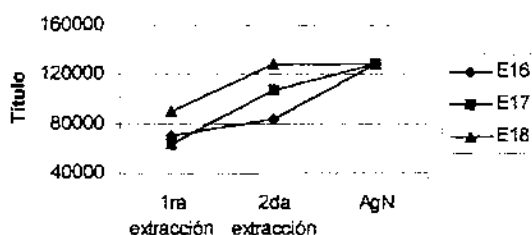


Fig. 1. Media de la respuesta de anticuerpos de los sueros de los ratones inmunizados con los tres péptidos sintéticos (E16, E17, E18).

BIBLIOGRAFIA

- Domínguez G., Wang C. and Frey T. Sequence of the genome RNA of rubella virus: evidence for genetic rearrangement during togavirus evolution. *Virology*, 177, 225, 1990.
- Wolinsky J., Sukholutsky E., Moore W., Lovett A., McCarthy M. and Adame B. An antibody- and synthetic peptide-defined rubella virus E1 glycoprotein neutralization domain. *J. Virology*, 67, 961, 1993.
- Merrifield R. Solid phase peptide synthesis. *Adv. Enzimol.*, 32, 221, 1969.
- Wolinsky J., McCarthy M., Allen-Cannady O., Moore W., Jin R., Cao S., Lovett A. and Simmons D. Monoclonal antibody-defined epitope map of expressed rubella virus protein domain. *J. Virology*, 65, 3986, 1991.
- Cordoba P., Grutaduria S.L., Cufíni C., Zapata M.T. Presence of neutralizing domain in isolates of rubella virus in Cordoba, Argentina. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 4, 493, 1997.
- Robinson K., Mostratos A. and Grecis R. Generation of rubella virus-neutralizing antibodies by vaccination with synthetic peptides. *FEMS-Immunol. Med. Microbiol.*, 10, 191, 1995.

Continuación de la página 98.

POLICOSANOL: MODO DE ACCION HIPOCOLESTEROLEMIZANTE Y EFECTOS SOBRE LA PEROXIDACION LIPIDICA

tiempo de latencia (T_{lat}) y la disminución de la velocidad de progresión (V_{prog}) en la cinética de formación de dienos conjugados provocada por la presencia de iones cúpricos (Cu^{2+}) y por la disminución del contenido de MDA en la fracción lipoproteica tanto antes como después de la oxidación con Cu^{2+} . Por otra parte, la protección sobre la parte proteica estuvo dada por un mayor contenido de grupos aminos libres en las lipoproteínas de las ratas tratadas tanto antes como después de la oxidación con Cu^{2+} .

Conocido este efecto antioxidante en ratas resultó de gran interés estudiarlo en humanos. Con tal objetivo se realizó primeramente un ensayo clínico en voluntarios sanos tratados con policosanol durante ocho semanas con las dosis posológicas habituales (5 y 10 mg/d). Una vez comprobada la eficacia hipocolesterolemizante del producto se procedió al estudio de la peroxidación lipídica de las LDL aisladas. Los resultados mostraron una reducción dosis-dependiente de la susceptibilidad de las LDL a la peroxidación lipídica mediada por Cu^{2+} , lo cual estuvo dado por un incremento significativo del T_{lat} y una disminución significativa de la V_{prog} . También aquí se estudió la peroxidación de las LDL mediada por macrófagos y se observó una disminución significativa de la concentración de MDA al finalizar la exposición de la lipoproteína a los macrófagos cultivados. Estos resultados permitieron concluir que el policosanol protege a las LDL humanas de la peroxidación.

Para conocer si el efecto antioxidante sobre las LDL se observa en los pacientes hacia los cuales va dirigido el consumo de policosanol como agente hipocolesterolemizante y conociendo que las LDL de estos pacientes son más susceptibles a la peroxidación lipídica; se seleccionó un grupo de pacientes con hipercolesterolemia familiar tipo II y con dos o más factores concomitantes de riesgo ateroesclerótico que fueron distribuidos de manera aleatoria y a doble ciegos en dos grupos (10 pacientes/grupo) y recibieron tabletas idénticas de placebo o policosanol en su dosis de partida (5 mg/d) durante doce semanas. Al finalizar el tratamiento, se comprobó la eficacia hipocolesterolemizante del producto y se estudió la cinética de formación de dienos conjugados en las LDL expuestas a la peroxidación con Cu^{2+} , la comparación de los resultados respecto a los niveles basales mostró un incremento significativo del T_{lat} , mientras que no mostró diferencias significativas de la V_{prog} . Por otra parte, la comparación entre grupos no mostró significación estadística, lo cual puede estar relacionado con el reducido tamaño de la muestra y/o con el hecho de que los pacientes de elevado riesgo requieran dosis mayores para garantizar una efectiva inhibición de la peroxidación lipídica. Teniendo en cuenta el papel de la peroxidación lipídica de las LDL en la patogenia de la aterosclerosis, los efectos protectores que ejerce el policosanol sobre la oxidación de las LDL pueden inhibir no sólo el proceso inicial de formación de la placa ateroesclerótica, sino también, la progresión de las lesiones vasculares y la aparición de complicaciones tromboembólicas propias de estados más complicados de esta enfermedad.

La tesis consta de nueve capítulos. El primero, presenta la introducción en la que se incluye la hipótesis de trabajo y sus objetivos. El segundo, corresponde a la revisión bibliográfica y en ella se expone una panorámica general y actualizada sobre la biosíntesis de colesterol y su regulación, el transporte de colesterol en las lipoproteínas plasmáticas y su endocitosis a través de receptores, la función y regulación de los receptores de la LDL, el perfil lipídico como factor de riesgo coronario, las drogas hipocolesterolemizantes, los efectos pleiotrópicos de las drogas hipolipemiantes, el papel de la peroxidación lipídica en la patogénesis de la aterosclerosis y los efectos hipocolesterolemizantes del policosanol. El tercero, se refiere a los materiales empleados, las técnicas desarrolladas y el diseño de las experiencias realizadas. El cuarto, presenta los resultados, los cuales son discutidos en el quinto capítulo. Para ilustrar los resultados se intercalan en ellos 28 figuras y 17 tablas. Las conclusiones y las recomendaciones se recogen de manera independiente en los capítulos seis y siete respectivamente. En el octavo capítulo, se presentan en orden alfabético las citas bibliográficas (292) citadas en el texto y en el noveno se informan las referencias correspondientes a cinco publicaciones en revistas internacionales de mediano y alto impacto de los resultados presentados en la tesis.

Este trabajo de tesis es parte de una línea priorizada de investigación en Cuba, puesto que los eventos cardiovasculares se encuentran entre las principales causas de muerte en este país. La novedad científica está determinada fundamentalmente por los resultados a los cuales arriba el trabajo. De esta forma, tras el estudio en modelos *in vivo* e *in vitro* y los estudios clínicos se profundiza en el mecanismo de acción a través del cual el policosanol ejerce sus acciones antiateroescleróticas. El aporte práctico y social está dado porque el conocimiento del mecanismo de acción de un medicamento es importante para la obtención y aprobación de su Registro Sanitario. Este hecho reviste particular importancia, ya que el policosanol es un nuevo agente con efectos hipocolesterolemizantes y antiateroescleróticos y el conocimiento de los mecanismos que subyacen en estos efectos farmacológicos contribuye a aumentar la información y credibilidad de los resultados obtenidos en los estudios clínicos, es útil en la indicación del uso simultáneo con otros medicamentos similares y contribuye a optimizar la promoción del producto en el mercado nacional e internacional. Estos factores han incidido positivamente en la obtención del Registro Sanitario del policosanol en Cuba y en numerosos países y en el volumen de ventas alcanzado.

Los resultados expuestos en la tesis han sido presentados también en la modalidad de cartel en cinco foros internacionales.