

COMUNICACION CORTA

Antigenicidad e inmunogenicidad de péptidos sintéticos de tres proteínas de la cápside del virus de la hepatitis A

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

Laboratorio de Anticuerpos Monoclonales, *Laboratorio de Hepatitis, ***Laboratorio de Síntesis de Péptidos y ****Dpto. de Bioterio, Centro de Inmunoensayo, Avenida 25 y 134, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. **Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri", Marianao, Ciudad de La Habana, Cuba.

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

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

El virus de la hepatitis A presenta como ácido nucleico una cadena de ARN simple con sentido positivo, cuyo genoma posee una longitud de aproximadamente 7 480 nucleótidos. Además, es hepatotrópico y está clasificado dentro del género *Hepatovirus* en la familia *Picornaviridae*.

La cápside del virus está compuesta por proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y posiblemente una VP4.^{1,2} Las dificultades encontradas para la obtención del antígeno natural empleando el cultivo de tejido, han propiciado el desarrollo y empleo de péptidos sintéticos para simular la estructura de los sitios antígenicos.

En el presente trabajo, se sintetizó un grupo de péptidos correspondientes a las glicoproteínas de la cápside VP1 (b1, 100-127; b3, 69-84; b4, 10-35; b6, 170-196), VP2 (b7, 53-77) y VP3 (b9, 34-58; e8, 137-150; e9, 110-121; e10, 62-75), además, se evaluó la antigenicidad de todos estos péptidos sintéticos, así como la inmunogenicidad del péptido sintético de la VP1(b4; 10-35) en la línea de ratones BALB/c.

Los péptidos estudiados fueron sintetizados según el procedimiento descrito por Merrifield en 1963. La pureza de los péptidos se analizó con la ayuda de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución mediante cromatografía en fase reversa.³

Para la obtención del líquido ascítico hiperinmune (LAH) anti HAV, se emplearon ratones BALB/c inmunizados con 100 µg/mL del antígeno natural.

Para la determinación de la inmunogenicidad y antigenicidad, se empleó un ensayo ultramicroELISA en el que las placas fueron recubiertas a razón de 2 µg/mL de cada péptido. Alternativamente, se utilizó un ensayo de inhibición, en el que los antisueros anti HAV fueron pre-incubados con el antígeno de HAV.

La evaluación de los ratones inmunizados con el antígeno natural se llevó a cabo empleando los nueve péptidos sintetizados (Tabla 1).

La evaluación del título de los ratones durante y después de concluido el esquema de inmunización, osciló entre 1:16 000 y 1:64 000 para los ratones inmunizados con el antígeno natural con un título después de la inhibición de 1:16 000. En el caso de los ratones inmunizados con péptido, el título osciló entre 1:8 000 hasta 1:40 000 y después de la inhibición de 1:8 000 (Fig. 1).

La particular complejidad de los sitios antígenicos de las proteínas de la cápside ha sido bien estudiada, debido a que diferentes dominios de estas proteínas no inducen anticuerpos neutralizantes.⁴

Los resultados coinciden con los hallazgos de otros investigadores; en

Tabla 1. Resultados de la evaluación de los ratones inmunizados con el antígeno natural (AgN) para cada péptido sintetizado.

Péptidos	Título	Inhibición con el AgN
b1(VP1)	64 000	16 000
b3(VP1)	32 000	8 000
b4(VP1)	64 000	16 000
b6(VP1)	64 000	32 000
b7(VP2)	16 000	800
b9 (VP3)	32 000	8 000
e8 (VP3)	64 000	16 000
e9 (VP3)	128 000	32 000
e10(VP3)	64 000	16 000

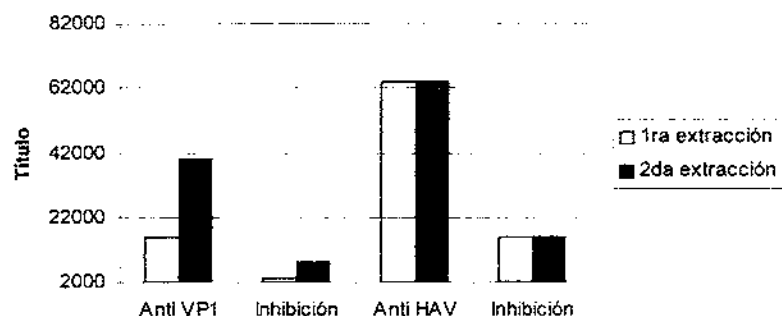


Fig. 1. Comparación de los títulos de los sueros de los ratones inmunizados con el antígeno natural y el péptido sintético VP1 (b4). Resultados de la prueba de inhibición con el antígeno natural.

los que el péptido sintético correspondiente a la secuencia b4, con secuencia aminoacídica 10 a 35 de la VP1, presentó una elevada respuesta de anticuerpos antipéptido. Diferentes investigadores han establecido el papel primordial que presenta la proteína de la cápside VP1 en la antigenicidad, además, otros han demostrado claramente que al igual que la VP1, la VP3 también se encuentra involucrada en el reconocimiento por parte del sistema inmunológico.⁵

Se ha encontrado reactividad de anticuerpos contra péptidos sintéti-

cos VP3 aa 110-121 y 31-47 que reconocen la proteína nativa. La secuencia del péptido e10 (aa 62-75) de la VP3, fue estudiada por Kusov Yu. Yu y colaboradores en 1991. Asimismo, evaluaron los antisueros generados contra aquel y reconocieron por Western Blot una proteína de 27 kD que corresponde a la VP3.⁶ Observaron además, un pobre reconocimiento del péptido de la VP2 (b7, 53-77).

Los presentes resultados sirven de soporte en la generación de nuevos anticuerpos monoclonales para su empleo en el desarrollo de ensa-

yos de tipo UMEISA con el principio de captura para la detección de anticuerpos IgM específicos al virus de la hepatitis A.

BIBLIOGRAFIA

1. Lemon S. and Robertson B. Current perspective in the virology and molecular biology of hepatitis A virus. *Virology*, 4, 285, 1993.
2. Linemeyer D., Menke J. and Martin-Gallardo A. Molecular cloning and partial sequencing of hepatitis A viral cDNA. *J. Virol.*, 54, 247, 1985.
3. Merrifield R. Solid phase peptide synthesis. *Adv. Enzimol.*, 32, 221, 1969.
4. Van Regenmortel M. Synthetic peptides versus natural antigens in immunoassays. *Annales de Biologie Clinique*, 51, 39, 1993.
5. Haro I., Pinto R.M., González Dankart J.F., Pérez J.A., Reig E., Bosch A. Anti-hepatitis A virus antibody response elicited in mice by different forms of a synthetic VP1 peptide. *Microbiol. Immunol.*, 39, 485, 1995.
6. Kusov Yu. Yu., Kazachkov Yu. A., Dzagurov G., Nastashenko T., Kozhich A., Gabrielyan A., Chikin L., Ivanov V. and Balayan M. Synthetic peptide 63-75 VP3 of hepatitis A virus induced virus-binding antibodies. *Vopr. Virusol.*, 36, 114, 1991.

DECIMA CONFERENCIA CIENTIFICA DEL INSTITUTO SUPERIOR POLITECNICO "JOSE ANTONIO ECHEVERRIA"

Ministerio de Educación Superior

Del 27 de noviembre al 2 de diciembre del 2000.

Ciudad de La Habana, Cuba.

Temáticas: Gestión universitaria ante el nuevo milenio. La organización de la ciencia y la técnica en las universidades. Primer congreso universitario de medio ambiente. Telemática y transmisión de datos. Bioingeniería, microelectrónica y electrónica aplicada, enseñanza de la ingeniería eléctrica, sistemas de control, la mujer en la ingeniería eléctrica. Enseñanza de la ingeniería civil, recursos del agua, carreteras y vías férreas. Enseñanza de la Matemática, la Logística, Ingeniería Industrial, Ingeniería de Sistemas e Informática Educativa. Enseñanza de la Química. Enseñanza de la Ingeniería y la Arquitectura ante los retos del nuevo milenio y las nuevas tecnologías de la información y las comunicaciones en la Educación Superior. El deporte, la educación física y la recreación.

Cuota de inscripción: 200.00 USD delegados y 100.00 USD acompañantes.

Se pagará en el momento de la acreditación de la Conferencia.

Presidente Comité Organizador: Dr. Arturo Boda González

Fax: (53)(7) 27 7129. **Correo electrónico:** boda@tesla.ispjae.edu.cu