

Actividad angiogénica en el carcinoma cervical asociado a virus de papiloma humano: oncogenes virales como blanco terapéutico

Omar López Ocejo, Mónica Bequet Romero, Patricia Hernández Casañas, Manuel J Araña Rozains, Silvio E Perea Rodríguez, Pedro López Saura

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 21 4764; E-mail: omar.lopez@cigb.edu.cu

Introducción

La habilidad de los tumores para inducir y sostener el proceso angiogénico se atribuye a dos cambios funcionales fundamentales. El primero es un evento de pérdida de función, que implica la pérdida o regulación negativa de proteínas inhibitorias endógenas tales como Trombospondina-1 (TSP1) e $IFN\alpha$. El segundo cambio es un evento de ganancia de función en el cual los factores de crecimiento conocidos como estimuladores de la angiogénesis son inducidos. Ejemplos de tales estimuladores incluyen bFGF, IL-8, TGF β , y el TNF α , que actúan de manera indirecta, además del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que activa de manera directa y específica el endotelio vascular.

Es precisamente en el VEGF que se han centrado la mayoría de los esfuerzos dedicados a la supresión de la angiogénesis tumoral, ya que se sobreexpresa en la mayor parte de los tumores ligada al cambio al fenotipo angiogénico.

El presente trabajo estudia el fenómeno angiogénico en el cáncer cervical asociado al virus del papiloma humano (HPV), primeramente desde una óptica global, analizando la expresión de los moduladores más relevantes del proceso, y posteriormente, se centra en la búsqueda del elemento inductor del VEGF en este sistema. Para concluir se analiza la potencialidad de un esquema de bajas dosis y tratamiento prolongado con $IFN\alpha$, para revertir el fenotipo angiogénico en células HeLa.

Inducción de activadores y represión de inhibidores de la angiogénesis en líneas celulares positivas para las oncoproteínas del HPV-16

Aunque varios estudios recientes reflejan los niveles de factores angiogénicos en el suero de pacientes, las células secretoras de los mismos resultaban desconocidas. En el presente trabajo se evaluó la capacidad secretora de factores angiogénicos tumorales (TAF) por las células HPV-16+ y HPV-18+, analizándose, a nivel molecular, la identidad y el nivel de expresión de estos factores.

- Al tratar células endoteliales (HUVEC) con el medio condicionado por células HPV16+ en ausencia de otros mitógenos, se demostró que la presencia del genoma viral condiciona la expresión de una actividad proangiogénica hacia el medio de cultivo.
- A nivel molecular (Northern blot) se determinó el grado de expresión de algunos de los moduladores de la proliferación endotelial expresados en células HPV-16+. El análisis integral de estos resultados evidenció un aumento significativo en la expresión de las moléculas proangiogénicas y una disminución en el caso de las antiangiogénicas (Tabla).

Tabla. Expresión de los transcritos de moduladores de la angiogénesis. Para los factores proangiogénicos se tomó como valor basal el de las células RHEK, mientras que en el caso de las TSP los valores se refieren a C33-A.

	RHEK-1	C-33A	CaSki	HPK1A
IL-8	1	2,5	4	5,8
TNF α	1	2,3	3,8	4,8
TGF β 1	1	2	8	4,7
bFGF	1	2,5	4,9	4,2
VEGF	1	2,6	5,7	5,1
TSP-1	10,7	1	4	5
TSP-2	5,5	1	1,5	1,7

- El análisis del transcrito del VEGF en células HeLa (HPV-18+) demostró que el efecto sobre la transcripción de este gen no depende del subtipo viral. La determinación por ELISA de la proteína (VEGF) en el medio condicionado por estas células demostró que el aumento en los niveles de mRNA se traduce en un incremento en los niveles de proteína secretada.
- Un análisis por RT-PCR de las isoformas del VEGF demostró que todas se encuentran sobre-expresadas en células HPV-16+. Al igual que para cáncer de colon se demostró que existe un incremento mucho más significativo en los niveles de mRNA de VEGF₁₈₉ que resultaron 30 veces superiores a los hallados en HaCaT.

Desarrollo de un nuevo modelo murino que permite el estudio de la tumorigénesis asociada a HPV-16

Debido a la especificidad de especie del HPV los modelos que existían para evaluar la tumorigénesis asociada a este virus se restringían a ratones desnudos. Como parte de este trabajo se obtuvo un transfectante estable (3T3-16) para el genoma del HPV-16 a partir de una línea de fibroblastos murinos (3T3) de origen BALB/C.

- El análisis del fenotipo tumoral de la línea celular transformada por HPV-16, demostró que la inoculación de las mismas origina tumores en ratones BALB/C con características histopatológicas similares a las que presentan las lesiones cervicales asociadas a HPV-16. La densidad y la distribución alterada de la vasculatura en los tumores murinos reprodujo la morfología angiogénica de las lesiones premalignas de alto grado y del cáncer cervical humano.
- El estudio de la expresión del gen del VEGF por Northern blot evidenció un aumento significativo de la expresión del mRNA de este gen en 3T3-16 respecto a la línea parental 3T3, lo que corroboró los resultados del análisis patológico respecto al grado de vascularización de los tumores. Estos datos,

además, confirman la asociación entre la expresión del VEGF y la transformación maligna por HPV-16.

Los oncogenes y la angiogénesis tumoral: la oncoproteína E6 del HPV activa el promotor del gen del VEGF independiente de p53

Muchos son los trabajos que hasta ahora han tratado de explicar la base de la transformación maligna por HPV. La mayor parte de ellos se han enmarcado en el estudio de la actividad oncogénica de las proteínas tempranas codificadas por el genoma viral (E5, E6 y E7), teniendo en cuenta su influencia en la actividad de activadores de la transcripción y genes supresores de tumores (c-Jun, p53 y Rb entre otros). Otras alteraciones genéticas, además de la presencia del HPV pudieran contribuir a la patogénesis del cáncer cervical. Por ejemplo la mayoría de las displasias asociadas a HPV y a carcinomas cervicales expresan altos niveles de EGFR así como de su ligando (TGF α).

- Utilizando anticuerpos monoclonales neutralizantes desarrollados contra el receptor de EGF (hR3 y C225) y contra su ligando TGF α (Ab-3), se comprobó que en células HeLa la sobre-regulación del VEGF a nivel proteico no involucra el lazo autocrino EGF-EGFR presente en estas células.
- La co-transfección transiente en queratinocitos (HaCaT) y fibroblastos murinos (NIH3T3) de un plásmido que codifica la oncoproteína E6 del HPV-16 (pJ4 Ω 16E6) y una construcción reportera que incluye el promotor del VEGF (2.6 VEGF) acoplado al gen de la luciferasa, resultó en un incremento dosis-dependiente de la actividad del promotor del VEGF independientemente del tipo celular analizado. Este mismo análisis en fibroblastos *knock-out* para p53 (MEF p53 $^{-/-}$) demostró que la transactivación del promotor de VEGF por la oncoproteína E6 es independiente de su capacidad para inactivar p53.
- Empleando mutantes de delección del promotor del VEGF, se identificó una zona del mismo vinculada a su activación por la oncoproteína E6, que comprende la zona entre -194 y -50 pb relativo al sitio de inicio de la transcripción y donde se localizan 4 sitios consenso Sp1.

El IFN α produce un deterioro del balance angiogénico y una supresión de la tumorigenicidad de las células HeLa

Los IFN α son proteínas reguladoras con potentes actividades biológicas. El IFN α 2 fue el primer inhibidor

de angiogénesis usado en ensayos clínicos resultando efectivo en el tratamiento de hemangiomas de la infancia. En el caso del carcinoma cervical se conoce que el tratamiento de células HPV positivas con IFN α disminuye la expresión de los oncogenes virales; sin embargo, hasta ahora no se había descrito ningún efecto del mismo sobre moduladores del evento angiogénico.

- El estudio del efecto de un tratamiento prolongado (1 año) de células HeLa con concentraciones bajas y sin efecto antiproliferativo (200 UI/mL) de IFN α natural y recombinante α -2b, demostró que ambas preparaciones de IFN α son capaces de suprimir completamente la tumorigenicidad evaluada en ratones desnudos inoculados por vía subcutánea con 2×10^6 células. Sin embargo, se demostró que este comportamiento no fue debido a alteraciones en el patrón del DNA viral y más bien las células tratadas aumentaron su resistencia a las células NK.
- La investigación del efecto del IFN α sobre los mecanismos de inducción del evento angiogénico a nivel molecular, mostró un incremento de la expresión del mRNA del VEGF y un decrecimiento del bFGF, causando de esta manera un deterioro del balance angiogénico que pudiera justificar el cambio del fenotipo tumoral de las células HeLa tratadas con IFN α .

Conclusiones

El presente trabajo demuestra, primeramente, que la célula positiva para el genoma del HPV-16 (HPV-16+) sometida a condiciones de estrés reproduce el patrón de inducción de citocinas y factores de crecimiento pro-angiogénicos encontrados en suero de pacientes. En particular, los estudios acerca de la inducción del VEGF en células HPV+ demostraron que este evento es independiente del lazo autocrino EGFR-TGF α que se establece en este tipo celular. Además, en experimentos de transfección transiente se demostró por primera vez que la oncoproteína E6 (HPV-16) activa el promotor del gen del VEGF independientemente de su efecto inhibidor sobre p53. Este resultado señala a la oncoproteína E6 como un blanco terapéutico importante para la disminución de la angiogénesis en el carcinoma cervical. Por último, se analizó el efecto del IFN α , que fue el primer fármaco utilizado como antiangiogénico en la clínica, sobre los mecanismos de inducción del evento angiogénico en células HeLa (HPV-18), demostrándose el potencial efecto sobre mediadores de la angiogénesis de dicha molécula en el carcinoma cervical.

Caracterización estructural de proteínas recombinantes integrando diversos métodos e implicación en sus procedimientos de obtención y aplicación

Niury Acosta Contreras, Alejandro Beldarraín Iznaga, Tirso Pons, Glay Chinae, José A Cremata, Raquel Montesino, Marlene Mata, Daysi Barbería, Gustavo Furrázola, Gabriel Padrón, Gabriel Márquez, Ricardo Serrano

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.
Fax: (53-7) 21 8070; E-mail: alejandro.beldarraín@cigb.edu.cu

Introducción

Como se conoce desde hace muchos años, una proteína requiere determinado grado de su estructura nativa para realizar eficazmente su función. Por esta razón, la caracterización físico-química para demostrar la estructura correspondiente a una proteína biológicamente activa, está incluida en las regulaciones vigentes para productos biológicos y biotecnológicos [1]. A esto se adiciona el interés de conocer la influencia de los factores externos en la estabilidad como una herramienta útil de diagnóstico en la evaluación de la integridad estructural.

La combinación de técnicas espectroscópicas y calorimétricas constituye una metodología para la caracterización físico-química de proteínas obtenidas por recombinación genética.

En este trabajo se presenta la primera caracterización de los parámetros que influyen en la estabilidad conformacional y el desarrollo de métodos para la elucidación del plegamiento de proteínas recombinantes obtenidas en el CIGB. Además, dichos métodos contribuyen a validar los métodos teóricos utilizados para predecir la estructura tridimensional de varias de estas proteínas.

La combinación de la calorimetría diferencial de barrido, el dicroísmo circular, la fluorescencia y la RMN ha servido para evaluar la estabilidad conformacional de la invertasa expresada en *Hansenula polymorpha* y *P. pastoris*, de la proteasa aspártica y la dextranasa expresadas en *Pichia pastoris*, el rHu-IFN- γ y la rSk expresadas en *Escherichia coli*, en función del pH y la fuerza iónica.

Dextranasa [2]

Dicroísmo circular. Se corroboró que el mayor porcentaje de elementos de estructura secundaria son láminas β y que este porcentaje no se afecta en el rango de pH entre 5 y 7, ni por el proceso de desglucosilación.

La combinación de diferentes métodos teóricos para la predicción de estructura tridimensional de proteínas y el método de dicroísmo circular, nos permitió proponer una estructura del tipo propela β para dicha enzima. Este modelo tridimensional constituyó la base para el diseño de mutaciones puntuales con el objetivo de estudiar el mecanismo catalítico de la enzima.

Interferon gamma [3]

Dicroísmo circular. Se demostró que la estructura de hélices α que caracteriza a esta proteína se ve afectada visiblemente con la composición del solvente en función del pH, la temperatura y la fuerza iónica.

Calorimetría diferencial de barrido. Se demostró que la desnaturalización térmica es irreversible a con-

centraciones elevadas de tampón en el rango de pH 2-10, aunque se encontró que a pH 3,5-5,4 y baja fuerza iónica las transiciones calorimétricas son reversibles. La entalpía de desnaturalización $\Delta H(T_m)$, a la temperatura de desnaturalización T_m , fue una función de T_m y de la concentración del tampón, conllevando a la disminución de la capacidad calorífica con la concentración del tampón.

Fluorescencia. Se demostró que la estabilidad conformacional de la proteína depende del pH, la temperatura y la fuerza iónica.

1H RMN. Se demostró la influencia de la temperatura y el pH en la exposición de los residuos de histidinas al solvente.

Proteasa aspártica [4]

Dicroísmo circular. Permitió demostrar que la estructura secundaria de la enzima recombinante en su estado nativo es de hojas β con un aporte significativo de contribuciones aromáticas, siendo bastante conservada con independencia del pH a baja fuerza iónica.

Calorimetría diferencial de barrido. Demostró que la desnaturalización térmica inducida es irreversible y dependiente de la velocidad de barrido. La desnaturalización térmica a pH 3-7 está caracterizada por una única endoterma. A valores de pH superiores a 7,5 la desnaturalización se caracteriza por dos endotermas. Este comportamiento indica una compleja estructura de la enzima que fue explicada basándonos en los datos cristalográficos de la pepsina de *Mucor pusillus* con la que nuestra enzima tiene un alto porcentaje de homología.

Fluorescencia. Demostró la estabilidad de la proteína en función del pH, obteniéndose a pH 5 la máxima estabilidad en correspondencia con los resultados de actividad.

Invertasa [5, 6]

Dicroísmo circular. Permitió demostrar que a pH 3-8 y baja fuerza iónica, la estructura secundaria de la enzima recombinante expresada en ambos hospederos es básicamente de hojas β , en correspondencia con los modelos teóricos propuestos. El efecto de la temperatura demostró que la glicosilación influye en la estabilidad conformacional de la enzima.

Calorimetría diferencial de barrido. Demostró que la estabilidad conformacional fue esencialmente similar para todas las condiciones estudiadas aunque siempre significativamente superior para la invertasa expresada en *Hansenula polymorpha*, sugiriendo que la presencia de los carbohidratos influye en la estabilidad global. Las desnaturalizaciones térmicas fueron siempre

1. International Conference on Harmonisation. Specifications: Test procedures and acceptance criteria for biotechnological/biological products. ICH Topic Q 6 B, 1999.

2. Pons T, Chinae G, Olmeda O, Beldarraín A, Roca H, Padrón G, et al. Structural model of Dex protein from *Penicillium minioluteum* and its implications in the mechanism of catalysis. Protein: Structure, Function and Genetics 1998;31:345-54.

3. Beldarraín A, López-Lacomba JL, Furrázola G, Barbería D, Cortijo M. Thermal denaturation of recombinant human γ -interferon. A calorimetric and spectroscopy study. Biochemistry 1999; 38(24):7865-73.

4. Beldarraín A, Acosta N, Montesinos R, Mata M, Cremata JA. Characterization of *Mucor pusillus* rennin expressed in *Pichia pastoris*: enzymic, spectroscopic and calorimetric studies. Biotechnol. Appl Biochem 2000;31(2):77-84.

5. Pons T, Olmeda O, Chinae G, Beldarraín A, Márquez G, Acosta N, et al. Structural model for family 32 of glycosylhydrolase enzyme. Protein: Structure, Function and Genetics 1998; 33:383-95.

6. Acosta N, Beldarraín A, Alonso Y. Characterization of recombinant invertase expressed in methylotrophic yeast. Biotechnol Appl Biochem 2000;32(3): 176-87.

irreversibles y la no-dependencia de la velocidad de barrido permitió el análisis de los datos utilizando la termodinámica de equilibrio.

Fluorescencia. Corroboró el comportamiento encontrado por calorimetría diferencial de barrido y dicroísmo circular. Además, evidenció que la irreversibilidad encontrada es producto de una cinética lenta de plegamiento a altas concentraciones.

La combinación de diferentes métodos teóricos para la predicción de estructura tridimensional de proteínas y el método de dicroísmo circular, nos permitió proponer una estructura del tipo propela β , para dicha enzima. Este modelo tridimensional es compatible con el mecanismo catalítico propuesto para este tipo de enzimas y sugiere un nuevo aminoácido involucrado en la unión al sustrato para las enzimas del tipo β -fructofuranosidasa.

Estreptoquinasa [7]

Dicroísmo circular. Permitted demostrar que a pH 2-10, independientemente de la fuerza iónica, la estructura secundaria $\alpha+\beta$ no se ve afectada por la composición del tampón a temperatura ambiente. Con el aumento de la temperatura toda la estructura se destruye en conjunto.

Calorimetría diferencial de barrido. Demostró que la estructura de múltiples dominios está fuertemente influenciada por el pH. La combinación del pH y la fuerza iónica demuestra efectos estabilizadores y desestabilizadores en dependencia de sus valores.

Fluorescencia. Corroboró el comportamiento encontrado por calorimetría diferencial de barrido y dicroísmo circular.

Conclusiones

Este trabajo es la primera caracterización de los parámetros que influyen en la estabilidad conformacional de proteínas obtenidas por técnicas de ingeniería genética en el CIGB y que tienen una gran importancia comercial.

Los parámetros calculados pueden ser utilizados dentro del error experimental como referencia durante el análisis de los lotes de proceso, donde cualquier desviación encontrada indicaría una variación en el plegamiento de la proteína y, por ende, en la calidad del producto obtenido.

Complementariamente, la combinación de estas técnicas puede proporcionar una valiosa información acerca de la naturaleza del desplegamiento de una macromolécula y de las fuerzas que influyen en la estabilidad del estado nativo. Por ello, pueden ser ampliamente utilizadas para la rápida y efectiva evaluación de moléculas nuevas o modificadas producidas por técnicas de ingeniería genética con relevancia científico-comercial, ya sea para uso clínico o industrial, siendo una herramienta indispensable en el momento de elegir una estrategia para la obtención de una molécula muy estable térmicamente en óptimas condiciones biológicas.

Además, pueden emplearse en el examen de la termodinámica de las interacciones entre macromoléculas y ligandos específicos en función de la temperatura, en estudios de oligomerización de proteínas o simplemente en la evaluación de la influencia de la estabilidad de una macromolécula en una formulación específica.

7. Beldarrain A, López-Lacomba JL, Serrano R, Kutysenko V, Cortijo M. Multidomain structure of a recombinant Streptokinase. A differential scanning calorimetry. *J Protein Chem* 2000 (In press).

7mo. Curso Internacional

El dengue: un desafío en el tercer milenio

Situación mundial del dengue y el dengue hemorrágico
Emergencia de las enfermedades virales asociadas a artrópodos y roedores

Epidemiología de la enfermedad y factores de riesgo
Clínica y terapéutica del dengue y el dengue hemorrágico
Diagnóstico de laboratorio

Biología molecular de los virus del dengue
Marcadores moleculares en la virulencia del dengue
Determinantes virales en la patogenia del dengue

Inmunopatogénesis del dengue
Nuevas lecciones en el dengue hemorrágico
Vacunas

Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí"
La Habana, agosto 13-24, 2001

Contacto:
María G. Guzmán
Instituto de Medicina Tropical
Autopista Novia del Mediodía Km 6
La Lisa, La Habana, Cuba
Tel.: 53-7-220450, 220633
Fax: 53-7-220633, 246051
E-mail: lupe@ipk.sld.cu
<http://www.sld.cu/instituciones/ipk/indice.htm>

Definición de un candidato vacunal contra el virus de la hepatitis C a partir de los resultados de estudios pre-clínicos

Santiago Dueñas-Carrera, Juan Morales, Liz Álvarez-Lajonchere, Julio C Álvarez, Lázaro J Lorenzo, Nelson Acosta-Rivero, Gillian Martínez, Ariel Viña, Ivis Guerra, Dagmara Pichardo, Antonieta Herrera, Rafael Martínez, Dania M Vásquez, Ricardo Silva, Karelía Cosme

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.
Telf.: (53-7) 21 6022; Fax: (53-7) 21 4764.

Introducción

De acuerdo con estimados recientes, existen aproximadamente 200 millones de personas infectadas de forma crónica por el virus de la hepatitis C (VHC), con frecuente aparición de formas severas como la cirrosis y el carcinoma hepatocelular. Estudios de prevalencia de anticuerpos anti-VHC en Cuba han mostrado un índice de 1,2% de la población total.

Hasta el momento no existe una vacuna contra el VHC disponible en el mercado y la terapia es efectiva en menos de 50% de los casos para las mejores alternativas de tratamiento con IFN- α combinado con otros antivirales.

Nuestro trabajo parte de la hipótesis de que es posible generar una respuesta inmune potente, diversa, modificable y activa frente a diferentes aislamientos del VHC mediante la inmunización con ADN plasmídico que codifica variantes de los antígenos de la región estructural del VHC, si se aprovechan las ventajas únicas de esta metodología.

Generación de los plasmidios para la inmunización con ADN

Primariamente, con el objetivo de evaluar de manera preliminar la inmunogenicidad de las proteínas de la región estructural del VHC, codificadas a partir de la secuencia nucleotídica de un aislamiento cubano, fueron obtenidas de manera individual diferentes variantes de estos antígenos por vía recombinante a partir de un sistema de expresión procariótico [1-3]. Estas variantes proteicas recombinantes de C, E1 y E2 resultaron muy inmunogénicas en ratones y conejos. Igualmente, estos antígenos resultaron inmunoreactivos contra sueros humanos anti-VHC, resultando funcionales en sistemas analíticos de tipo ELISA y en ensayos de linfoproliferación específicos [1-3].

De acuerdo con estos resultados, se generaron ocho variantes de plasmidios de inmunización con ADN utilizando secuencias que codifican los antígenos de la región estructural del VHC procedentes de un aislamiento cubano correspondiente al genotipo 1b [4]. El plasmidio pIDKCo contiene la secuencia codificante para los primeros 176 aminoácidos (aa) de la proteína de la cápsida. Los plasmidios pIDKE1S y pSIDKE1 contienen la secuencia codificante de E1 que comprenden los aa 192-363 de la poliproteína viral sola o fusionada al péptido señal de la eritropoyetina humana, respectivamente. Por su parte, pIDKE2S y pSIDKE2 contienen la secuencia codificante para la E2 que abarca los aa 384-716 de la poliproteína viral sola o fusionada al péptido señal de la eritropoyetina humana,

respectivamente. El plasmidio pIDKE1 contiene la secuencia codificante para los antígenos de la cápsida y E1 comprendida entre los aa 1 y 363 de la poliproteína viral. El pSIDKE1E2 contiene la secuencia codificante de E1 y E2 comprendida entre los aa 192 y 716 de la poliproteína viral fusionada al péptido señal de la eritropoyetina humana. Finalmente, el plasmidio pIDKRET contiene la secuencia codificante para los antígenos de la región estructural del VHC. Los plasmidios de inmunización construidos contienen variantes individuales o combinadas de las proteínas de la región estructural del VHC. Estas proteínas contienen la mayoría de los epítotos inmunológicamente relevantes del VHC, algunos de los cuales son comunes a la mayoría de los aislamientos virales.

Caracterización de la respuesta inmune inducida en diferentes modelos animales

Todos los plasmidios de inmunización con ADN referidos anteriormente, indujeron una respuesta inmune específica detectable contra el VHC en ratones. Los títulos de anticuerpos contra las proteínas de la región estructural del VHC inducidos en ratones por la vacunación con ADN, oscilaron entre 1:50 y 1:15000 de acuerdo (Tabla). Con el objetivo de comparar la respuesta humoral obtenida mediante la vacunación con ADN con la generada en individuos anti-VHC positivos, se investigaron los anticuerpos contra la cápsida viral. Estos

Tabla: Título de anticuerpos inducidos en ratones contra los antígenos de la región estructural del VHC después de la inmunización con diferentes plasmidios de expresión.

Plasmidio	Título de Ac contra Co	Título de Ac contra E1	Título de Ac contra E2
pAEC-K6	No, 0	No, 0	No, 0
pIDKCo	Sí, 8200	No, 0	No, 0
pIDKE1S	No, 0	Sí, 100	No, 0
pSIDKE1	No, 0	Sí, 55	No, 0
pIDKE2S	No, 0	No, 0	Sí, 57
pSIDKE2	No, 0	No, 0	Sí, 60
pIDKE1	Sí, 8400	Sí, 560	No, 0
pIDKRET	Sí, 15000	Sí, 6000	Sí, 8000
pSIDKE1E ₂	No, 0	Sí, 190	Sí, 135

Los resultados se muestran como el recíproco del título medio de anticuerpos contra los diferentes antígenos a la semana 27 de un esquema de inmunización de dos dosis en las semanas 0 y 3, inyectando por vía intramuscular 100 μ g de cada uno de los plasmidios de expresión en solución fosfato salina. Sí, indica la presencia de la secuencia codificante para el antígeno analizado en el plasmidio de expresión; No, la ausencia.

1. Dueñas-Carrera S, Morales J, Acosta-Rivero N, Lorenzo LJ, García C, Ramos T, et al. Variable level expression of hepatitis C virus core protein in a prokaryotic system. Analysis of the humoral response in rabbit. *Biotecnología Aplicada* 1999;16(4):226-31.

2. Lorenzo LJ, García O, Acosta-Rivero N, Dueñas-Carrera S, Martínez G, Álvarez-Obregon J, et al. Expression and immunological evaluation of the *Escherichia coli*-derived hepatitis C virus envelope E1 protein. *Biotecnol Appl Biochem* 2000;32(2):137-43.

3. Martínez G, Viña A, Borges M, Martínez E, Morales J. Humoral immune response against hepatitis C virus envelope E2 variant expressed in *Escherichia coli*. *Biotecnología Aplicada* 2000;17:231-4.

anticuerpos son frecuentemente los primeros en aparecer durante la infección natural y aunque no parecen ser de naturaleza protectora, podrían estar relacionados con mecanismos de eliminación celular mediada por anticuerpos. Los anticuerpos específicos contra la proteína de la cápsida del VHC, producidos en animales inmunizados con el plásmido pIDKCo, aparecieron 5 semanas después de la primera dosis en un esquema de 2 dosis en las semanas 0 y 3 (datos no mostrados). Estos anticuerpos mostraron similar especificidad inmunológica que los detectados en individuos infectados con VHC [5]. Estos datos indican que los antígenos producidos *in vivo* después de la inmunización con ADN podrían tener una conformación similar a la propia cuando forman parte del virión natural. Sin embargo, los niveles de anticuerpos inducidos por la administración de pIDKCo, pIDKE1 y pIDKRET fueron generalmente superiores a los encontrados en individuos anti-VHC positivos [5], lo que resalta la inmunogenicidad de las proteínas de la región estructural generadas por esta vía.

Además, contrario a lo común para individuos infectados crónicamente con VHC, la inmunización con pIDKCo, pIDKE1 y pIDKRET posibilitó la generación de una respuesta linfoproliferativa específica de tipo CD4⁺ (Figura). La presencia de respuesta celular de tipo CD4⁺ se ha correlacionado frecuentemente con un curso benigno de la enfermedad o con su resolución.

Como parte de la evaluación de la estrategia de trabajo, se evidenció por primera vez la influencia directa del régimen de vacunación sobre la respuesta inmune generada contra el VHC mediante la inmunización con ADN en ratones. Durante el estudio de los efectos de la inmunización con pIDKCo y pIDKRET en ratones, se demostró la superioridad de los esquemas de dos dosis con 50 µg de ADN plasmídico con tres semanas de intervalo entre ellas. Estos resultados tienen implicaciones importantes en el diseño de experimentos de inmunización en otros hospederos.

También se ha evidenciado la generación de niveles de anticuerpos superiores a 1:1000, contra los antígenos de la región estructural del VHC, en conejos y macacos irus inmunizados con pIDKRET 14 semanas después de la primera dosis. Estos resultados indican que, contrario a otras alternativas evaluadas internacionalmente, la inmunogenicidad evidenciada por la

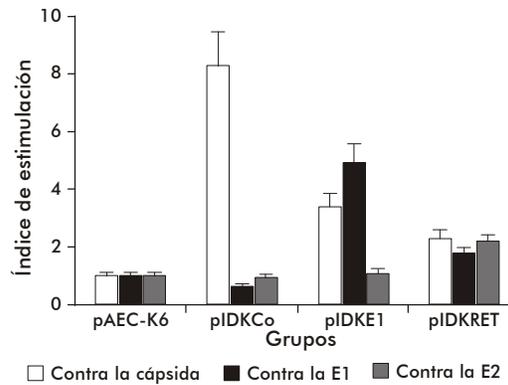


Figura. Proliferación de linfocitos de bazo, provenientes de ratones inmunizados con pIDKCo, pIDKE1 y pIDKE2 frente a proteínas de la región estructural obtenidas por la vía recombinante. pAEC-K6 es el plásmido control negativo. El índice de estimulación se determina de la siguiente forma: $IE = \text{cpm (exp)} - \text{cpm (basal)}$. Las desviaciones estándar basadas en el cálculo de tres determinaciones diferentes se muestran por las barras de error en sentido positivo.

inmunización con el plásmido pIDKRET no decae en animales robustos.

Conclusiones

Este trabajo posee un alto nivel de novedad científica dada fundamentalmente por los materiales biológicos y los procedimientos descritos. El plásmido pIDKRET incluye en su composición la secuencia nucleotídica proveniente del genoma de un aislamiento cubano del VHC, el cual posee al menos 8% de diferencia, a este nivel, con respecto a los otros reportados. Además, el fragmento aminoacídico comprendido en la versión proteica resultante no había sido explorado previamente con este enfoque vacunal. Esta región contiene la mayoría de los epítomos inmunológicamente relevantes del VHC y su presencia simultánea parece tener un efecto sinérgico, no demostrado con anterioridad, de potenciación y diversificación de la respuesta inmune específica generada después de la administración del plásmido.

Actualmente se continúan estos estudios y se profundiza en el análisis de la respuesta inmune. Se investiga también la influencia de las estrategias de vacunación y formulación con los plásmidos pIDKCo y pIDKRET en conejos y carneros para el posterior tránsito a chimpancés.

4. Morales J, Viña A, García C, Acosta-Rivero N, Dueñas-Carrera S, García O, Guerra I, inventors; CIGB, assignee. Sequences derived from the genome of the hepatitis C virus, and use thereof. WO 98/25960.

5. Dueñas-Carrera S, Álvarez-Lajonchere L, Álvarez-Obregón JC, Herrera AM, Lorenzo LJ, Pichardo D, et al. A truncated variant of the hepatitis C virus core induces a slow but potent immune response in mice following DNA immunization. *Vaccine* 2000;19(7):992-7.

Expresión de fragmentos de anticuerpos activos en plantas transgénicas de tabaco

Nadia Ramírez,¹ Marta Ayala,¹ Pedro Oramas,¹ Jorge Gavilondo,¹ Marlene Pérez,¹ Damaryst Lorenzo,¹ Meilyn Rodríguez,¹ Lissett Herrera,² Daniel Palenzuela,¹ Alejandro Fuente,¹ Viviana Falcón,¹ Vivian Doreste¹

¹Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave. 31 e/ 158 y 190, Playa. AP 6162. CP 10600. Ciudad de La Habana. Cuba. Fax: (53-7) 33 6008; E-mail: nadia.ramirez@cigb.edu.cu

²Centro de Biplantas. Ciego de Ávila. Cuba.

Introducción

La idea de expresar el fragmento scFv en plantas transgénicas se deriva de información internacional creciente que sugiere que, para un conjunto de anticuerpos terapéuticos y sus fragmentos, las plantas transgénicas pueden constituir una variante productiva más económica que otros sistemas, y donde se pueden alcanzar volúmenes muy grandes del producto final.

El presente trabajo está encaminado a evaluar bajo qué condiciones y hacia cuáles compartimentos celulares puede realizarse la expresión del scFv antiHBsAg.

Clonación del gen antiHBsAg y transformación de plantas de tabaco

A partir de la construcción bacteriana [1] se aisló el gen que codifica para el fragmento scFv antiHBsAg, más una secuencia N-terminal de 6 histidinas, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Se emplearon para ello oligonucleótidos específicos que además confirieron al gen sitios de restricción adecuados para la clonación en vectores de plantas que contenían la región promotora 35S de expresión constitutiva, provenientes del virus de mosaico de la coliflor, el terminador Nos de la nopalina-sintetasa y diferentes señales de localización (el prepéptido y el propéptido de la esporamina del boniato, y una secuencia KDEL C-terminal para la retención en retículo endoplasmático). Se fabricaron 4 construcciones genéticas con el fin de evaluar el comportamiento de la expresión del scFv en diferentes compartimentos: retículo endoplasmático, vacuola, fluido apoplástico y citosol. Todas las construcciones se sometieron a un análisis de secuencia con lo cual se verificaron los empalmes realizados y la ausencia de mutaciones en el gen clonado. Los cuatro "cassettes" se subclonaron en un vector de expresión para la transformación de plantas mediante el método de *Agrobacterium tumefaciens*.

Se transformaron plantas de tabaco var. Petit Havana SR1 y se obtuvieron plantas F0 resistentes a kanamicina. La presencia del transgén se chequeó por PCR. Plantas F1 representativas de cada una de las cuatro construcciones genéticas, se ensayaron mediante un ELISA cuantitativo específico, basado en un recubrimiento con HBsAg recombinante, un anticuerpo policlonal de conejo anti-Fab específico al anticuerpo original murino anti-HBsAg, y un anticuerpo policlonal anti-IgG de conejo conjugado a la enzima fosfatasa alcalina para revelar la reacción. El ELISA se calibró mediante una curva estándar empleando scFv bacteriano purificado por cromatografía de afinidad. Las muestras se obtuvieron a partir de hojas verdes frescas molidas y tratadas con un tampón adecuado.

Detección de la expresión de la proteína en plantas de tabaco

El ELISA indicó que la mayor expresión de scFv activo se producía en las plantas transformadas con la construcción para la acumulación en el retículo endoplasmático (alrededor de 0,3% del total de proteínas soluble extraídas [TPS]). Las plantas correspondientes a las construcciones para vacuola y fluido apoplástico exhibieron por cientos de expresión menores (0,01%-0,03% TPS). No se detectó expresión del fragmento activo en el citosol.

Líneas de plantas representativas de cada una de las cuatro construcciones (RE-52 para retículo endoplasmático, AF-12 para fluido apoplástico, V-20 para vacuola, y C-17 para citosol) se emplearon para un experimento de Western blot que detecta scFv total (activo y no activo), al revelarse con el anticuerpo anti-Fab mencionado antes. Este experimento repitió el comportamiento detectado en el ELISA cuantitativo.

Se purificó entonces ácido ribonucleico (ARN) de estas cuatro líneas y se desarrolló una reacción de transcripción inversa (RT)-PCR con oligonucleótidos específicos para el gen del scFv. En este experimento demostramos que en las cuatro líneas se produce ARN mensajero específico. Estos resultados sugieren que la no detección de expresión de proteína scFv en el citosol puede deberse a problemas en la traducción o postraduccionales. En el ambiente del citosol, sin proteínas chaperonas ni un ambiente proclive a la formación de los enlaces disulfuros, la proteína naciente es probablemente degradada rápidamente por proteasas citosólicas.

La localización del fragmento de anticuerpo se chequeó primero mediante un experimento donde se infiltraron las hojas verdes frescas de las construcciones RE, AF y V, y el fluido extracelular resultante se concentró y estudió por Western blot. Se demostró que sólo la construcción AF-12 producía una banda detectable de la talla esperada para el scFv. Esto sugiere por un lado que el segmento KDEL añadido para la retención en retículo endoplasmático funciona. Este segmento pudiera también ser responsable del mayor nivel de expresión encontrado para esta construcción, ya que se reporta que la misma protege de las proteasas citosólicas el extremo C-terminal de la proteína recién traducida, antes de su translocación final al retículo.

Se realizó también un estudio de las células vegetales de cada construcción mediante inmunomicroscopía electrónica, empleando el anticuerpo anti-Fab marcado con oro coloidal. Se demostró marcaje en vacuolas sólo en la construcción V-20, marcaje en el apoplasto en la construcción AF-12, comprobándose que las secuencias

1. Ayala M, Fernández-de-Cossío ME, Canaan-Haden L, Balint RF, Larrick JW, Gavilondo JV. Variable Region Sequence Modulates Periplasmic Export of a Single Chain Fv Antibody Fragment in *E. coli*. *BioTechniques* 1995;18: 832-42.

señales empleadas en este caso (pre y propéptido de la esporamina) habían sido efectivas para la localización dirigida del fragmento de anticuerpo. En estos experimentos tampoco se detectó scFv en las muestras de la construcción citosólica. En la construcción RE-52 se obtuvieron evidencias iniciales de que en algunas células el scFv podía aparecer en núcleo y cloroplasto, resultado que debe ser profundizado debido a que ha sido reportado sólo en un estudio anterior de otros autores.

Purificación de la proteína

Finalmente, se procedió a la purificación del scFv a partir de material molido de hojas verdes frescas de la línea RE-52, y fluido de infiltración de hojas verdes frescas de la línea AF-12. Para ello se empleó la cromatografía de afinidad por iones metálicos inmobilizados (IMAC), que había sido ya empleada con éxito en el CIGB para la purificación del scFv obtenido en *E. coli*, aprovechando el segmento N-terminal de 6 histidinas que posee la proteína.

Luego de un solo paso de cromatografía se obtuvieron altos porcentajes de pureza (95% y 94% para ER-52 y AF-12, respectivamente), y recobrados específicos (fragmento aplicado *versus* fragmento eluido, corregido para pureza final) de 70% y 60% para ER-52 y AF-12, respectivamente. Teniendo en cuenta la cantidad de proteína aplicada en la purificación, y con el dato de la cantidad de material verde que debe ser procesado en cada caso (molida e infiltración), se calculó que es posible producir entre 20-25 µg/g de hoja para ER-52, y entre 7-8 µg/g de hoja para AF-12. Al scFv purificado por IMAC se le determinó la actividad específica mediante el ELISA cuantitativo. El valor obtenido para ER-52 fue de 82,5%, mientras que para AF-12 fue de 69%.

Ajustando las cantidades obtenidas a escala de laboratorio y sin someter el proceso de extracción/purificación a optimización, la proyección inicial de scFv puro y activo por hectárea llega a alrededor de 1 kg total, dependiente del método de cultivo empleado.

Se estableció también una suspensión celular estable en cultivo a partir de células de callos de la línea transgénica AF-12. Se demostró que el scFv se obtiene activo tanto en el sobrenadante de cultivo (donde

es estable por más de 8\98 h), como a partir del extracto celular. Estos materiales pudieron purificarse también por IMAC. La proteína purificada se secuenció en su extremo N-terminal y se comprobó que las secuencias empleadas para la localización de la proteína en este compartimiento extracelular se procesan correctamente.

También se evaluaron semillas provenientes de las plantas transgénicas derivadas de las líneas AF-12 y V-20. Se demostró que al menos hasta la tercera generación se mantiene en las plantas transformadas el carácter introducido. Se comprobó además que de estas semillas es posible extraer el scFv activo (medido por ELISA) y en cantidades similares hasta 18 meses después de colectadas y almacenadas a temperatura ambiente. A pesar de que no se usó un promotor específico para semillas, el por ciento de expresión de proteína respecto a las proteínas solubles purificadas fue de alrededor de 0,2%.

Conclusiones

Nuestro trabajo demuestra que este scFv particular se expresa exitosamente en plantas transgénicas de tabaco, que mantienen una estabilidad aceptable del carácter introducido, y de las cuales pueden obtenerse grandes volúmenes del fragmento activo puro mediante procedimientos relativamente sencillos. Debido a estas características, así como a las ventajas de esta tecnología relativas a la ausencia de virus infectivos para el hombre, o ADN y LPS bacterianos contaminantes, se ha comenzado un estudio de escalado que produzca una optimización del proceso a la par de un estudio detallado de costos, en comparación con la fermentación bacteriana para obtener cantidades del orden de kg del scFv/año.

Estos resultados han abierto el camino para la introducción de esta nueva tecnología a la producción de otros anticuerpos y fragmentos. Ya se han comenzado los trabajos conjuntos con el Centro de Inmunología Molecular de La Habana, Cuba para la expresión de dos anticuerpos terapéuticos de ese centro en plantas transgénicas de tabaco, como forma de escalado que permita superar las limitaciones en costo y capacidad de la producción a partir de cultivo de hibridomas.

Estudios postlicenciamiento de la vacuna cubana contra la hepatitis B, Heberbiovac-HB

Verena Muzio González,¹ Zurina Cinza Estévez,¹ Abraham Ortega Tápanes,¹
Gloria Véliz Ríos,¹ Miguel A Galindo,² Graciela Delgado,² Manuel Díaz,³
Licel Rodríguez,³ José Bravo,³ Plácido Pedroso Flaquet,³ et al.*

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. PO Box 6162, CP 10600,
Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 21 4764; E-mail: verena.muzio@cigb.edu.cu

²Ministerio de Salud Pública. Calle 23 esq. M, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.

³Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí".

Introducción

El proceso de licenciamiento de una vacuna pasa generalmente por la ejecución de tres fases de estudios clínicos controlados que demuestran, en primer lugar, que la vacuna es segura, y, en segundo lugar, que es eficaz. Una vez otorgada la licencia al producto, corresponde la última fase de estudio, también conocida como de postmercadeo, postlicenciamiento o fase IV. En ella se pueden realizar diferentes tipos de investigaciones con el objetivo fundamental de evaluar la seguridad y efectividad del producto en las condiciones de la práctica habitual, sobre una población específica.

La seguridad, inmunogenicidad y eficacia de la vacuna recombinante cubana contra la hepatitis B, Heberbiovac HB, ha sido ampliamente evaluada en más de 50 estudios clínicos controlados, llevados a cabo en Cuba y en 10 países de diversos continentes. En estos estudios han participado alrededor de 4 000 adultos y 2 000 niños.

En Cuba existe un programa de vacunación contra la hepatitis B que se inició con la introducción de esta vacuna desde 1992, constituyendo el primer y más amplio programa de vacunación en las Américas. Sin embargo, a pesar de las altas coberturas de vacunación alcanzadas (más de 98% en menores de 1 año de edad desde 1994), hasta el presente no existían estudios de Fase IV diseñados con el objetivo de disponer de la información de la seguridad de la vacuna, su inmunogenicidad y eficacia en las condiciones habituales de las prácticas de inmunización establecidas en el país.

A continuación se describen por separado tres estudios de Fase IV diseñados con ese fin.

Evaluación postlicenciamiento de la seguridad de la vacuna Heberbiovac HB

Se llevó a cabo mediante un estudio retrospectivo en niños sobre eventos adversos asociados a Heberbiovac HB en tres municipios de Ciudad de La Habana. Con el objetivo de registrar de forma retrospectiva todos los eventos adversos que ocurrieron durante los siete días posteriores a la aplicación de cada dosis de vacuna anti-hepatitis B, se revisó la información recogida en las Historias Clínicas de niños en el primer año de vida, durante siete años (1992-1998) en tres municipios de Ciudad de La Habana.

El estudio observacional retrospectivo de corte transversal, incluyó una muestra de 13 846 niños menores de 7 años de los municipios Plaza de la Revolución, Cerro y Marianao. Se consideraron eventos adversos todas las incidencias médicas ocurridas a partir

del momento de la aplicación de cada dosis y durante los siete días siguientes, tuviesen o no una relación causal con la aplicación de la vacuna. Se diseñaron bases de datos para su almacenamiento y procesamiento con el sistema Microsoft Access.

De las 40 533 dosis administradas, en 289 se reportaron eventos adversos, lo que representa una incidencia de 0,71% que puede considerarse baja. No hubo diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la proporción de eventos adversos para el total de dosis aplicadas, entre hembras y varones. Las manifestaciones más frecuentemente registradas como eventos adversos, respecto al total de dosis administradas, fueron: dolor en el sitio de inoculación (considerado como llanto a la palpación en el sitio de inoculación) (0,15%), febrícula (0,14%) y enrojecimiento en el sitio de la inyección (0,10%). No se reportaron casos de secuelas ni fallecidos.

Se concluyó que la vacuna Heberbiovac HB muestra un excelente perfil de seguridad en su utilización rutinaria en la práctica habitual del programa de vacunación establecido en nuestro país, lo que corroboró los resultados que previamente se habían obtenido con esta vacuna en estudios clínicos controlados.

Evaluación postlicenciamiento de la inmunogenicidad de la vacuna Heberbiovac HB

Se realizó un estudio nacional de seroprevalencia de los títulos de anticuerpos contra el virus de la Hepatitis B en niños de 1 a 5 años, con el objetivo de evaluar el grado de protección en que se encuentran los niños cubanos, a quienes se le ha aplicado de forma masiva la vacuna cubana contra la Hepatitis B desde 1992 y el tiempo que se mantienen niveles protectores de anticuerpos después de la vacunación.

Se llevó a cabo un estudio pragmático que incluyó niños de las 14 provincias y del municipio especial Isla de la Juventud. Se escogieron 3 130 niños entre 1 y 5 años, hijos de madres sin marcadores de infección por el VHB en el momento del parto y que, además, tenían aplicada al menos una dosis de Heberbiovac HB. De los parámetros evaluados, el más importante fue la seroprotección (títulos de anticuerpos superiores a 10 UI/L).

El 96,82% de los niños cubanos entre 1 y 5 años se encuentran protegidos contra la Hepatitis B, gracias a la vacunación con Heberbiovac HB. En todos los grupos de edad se encontraron por cientos de protección por encima de 90%. Sólo 100 niños presentaron títulos

*Dada la magnitud de estos tres estudios, en su realización participó también un gran número de especialistas de decenas de instituciones.

menores de 10 UI/L, para un 3.18% del total. La respuesta inmune obtenida es duradera, ya que 95,36% de los niños vacunados se mantienen protegidos 5 años después de la última dosis. La media geométrica de los títulos de anticuerpos (MGT) fue de 193,39 UI/L, cifra casi 20 veces por encima del nivel mínimo protector (10 UI/L).

Se demostró la alta capacidad de la vacuna cubana contra la Hepatitis B para provocar una respuesta inmune protectora ante el VHB, cuando se utiliza en las prácticas rutinarias de inmunización masiva de los niños recién nacidos que existe en nuestro país desde 1992.

Estos resultados están en correspondencia con los resultados de inmunogenicidad encontrados en estudios clínicos controlados y permiten explicar los resultados recogidos por el Ministerio de Salud Pública de Cuba al evaluar la incidencia de casos agudos de hepatitis B en la población vacunada, en la que se encuentra una marcada reducción en los niños menores de 15 años de edad, lo que representa las primeras evidencias del impacto que ha tenido la vacunación contra la hepatitis B en la población cubana vacunada.

Evaluación postlicenciamiento de la efectividad de la vacuna Heberbiovac HB

Se realizó un estudio de efectividad de la vacuna Heberbiovac HB en niños hijos de madres positivas al antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) en el período 1992-1999, con el objetivo de demostrar la eficacia de la vacuna Heberbiovac HB en hijos de madres HBsAg+ en condiciones de práctica habitual en el terreno.

Se evaluaron los sueros de 225 niños de las 14 provincias del país y del municipio especial Isla de la Juventud. La muestra del estudio estuvo constituida por lactantes de siete meses, que recibieron el esquema de vacunación establecido para estos casos (0, 1, 2 y 12

meses), a los cuales se les realizó una extracción de sangre para medir la presencia de HBsAg y anti-HBsAg.

De los 225 niños estudiados, sólo 9 (4%) mostraron presencia de HBsAg, en tanto que en los 216 (96%) restantes no se detectó el HBsAg y sí se evidenciaron anticuerpos anti-HBsAg. El 96,8% de los niños HBsAg negativos resultaron inmunizados con títulos protectores. Al analizar la calidad de la respuesta, 81,1% estos niños alcanzaron títulos de anticuerpos superiores a 100 UI/L y 28,3% hiperrespuesta (títulos >1 000 mUI/mL). La MGT de anti-HBsAg en el grupo de niños HBsAg negativos fue de 334,62 mUI/mL (I.C. 317,34 y 350,72). La efectividad de la vacuna medida para diferentes niveles de riesgo de infección en niños hijos de madres positivas al AgsHB, varió desde 93,6 (60% de riesgo) hasta 95,7% (90% de riesgo).

Se comprobó la elevada efectividad de la vacuna Heberbiovac HB aplicada en condiciones de trabajo normales en el Sistema Nacional de Salud. El 94,3% de todos los niños seroconvirtieron con títulos protectores y 96,8% de los niños no infectados (HBsAg negativo) estaban seroprottegidos. Este resultado es muy importante si se tiene en cuenta que estos niños recibieron la vacuna sola, sin la administración concomitante de gammaglobulina hiperinmune.

Conclusiones

Se demostró la alta seguridad de la vacuna en niños menores de 1 año de edad, en condiciones rutinarias de uso, y su alta capacidad para provocar una respuesta protectora contra el VHB en niños menores de 5 años. Esta respuesta es de larga duración pues al cabo de 5 años 95,4% de los niños vacunados se mantienen con títulos de anticuerpos protectores.

Se comprobó la elevada efectividad de Heberbiovac HB en las condiciones del sistema de salud y se demostró el impacto que ha tenido la vacunación en la prevención de la infección por VHB en niños de alto riesgo de infección, al ser hijos de madres portadoras del VHB.

Demostración del efecto inhibitor del extracto dializable de leucocitos sobre los factores transcripcionales esenciales para la expresión génica del VIH

Miriam Ojeda Ojeda, Celia Fernández-Ortega, Manuel de J Araña Rosáinz

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.

E-mail: miriam.ojeda@cigb.edu.cu

Introducción

Poco se conoce sobre los mecanismos de acción del extracto dializable de leucocitos (EDL) o factor de transferencia, sin embargo, numerosos estudios han establecido inequívocamente la eficacia del EDL en el tratamiento o prevención de diversas enfermedades de origen parasitario, bacteriano, viral y otras [1, 2]. Actualmente se desconocen los mecanismos moleculares precisos que median la actividad biológica del EDL sobre la infección por el VIH. Este trabajo presenta datos novedosos que indican un potente efecto supresor del EDL sobre la expresión génica del VIH.

Efecto inhibitorio de la preparación de EDL sobre la actividad del factor transcripcional NF-κB

Las proteínas pertenecientes a la familia NF-κB están implicadas en la regulación de disímiles procesos celulares tales como la respuesta inmune e inflamatoria, proliferación celular y apoptosis. Ha sido demostrado que los elementos κB son necesarios para la expresión génica inducible del VIH en células T activadas y monocitos maduros. La permeabilidad celular a la infección viral está estrechamente relacionada con la abundancia relativa de factores reguladores de la transcripción que interactúan con éstos y otras secuencias específicas dentro de la secuencia LTR (del inglés *long terminal repeat*) del VIH. La mutación de nucleótidos

determinantes en las secuencias *enhancer* involucradas en la unión del factor inducido NF-κB, convierte el elemento LTR del VIH en no respondedor a aquellos estímulos capaces de inducir la translocación nuclear de este factor transcripcional [3]. En este trabajo se estudió el efecto del EDL sobre la actividad de NF-κB en células CD4⁺ mediante ensayos de retardación en gel. El factor NF-κB es constitutivamente activo en la línea celular MT-4. Las células MT-4 se expusieron a diferentes dosis de EDL (0; 1,25 y 2,5 U/mL) durante 7 días de cultivo y se prepararon los extractos nucleares transcurridas 0 h, 3 h, 3 días y 7 días de tratamiento con la preparación de EDL.

Los resultados evidencian una disminución considerable de la actividad de unión de NF-κB en las células MT-4 tratadas con EDL en relación con las células no tratadas. La inhibición de la actividad de NF-κB se observó en tiempos tan tempranos como 3 h de cultivo en presencia de EDL. Períodos de incubación más prolongados potencian el efecto inhibitorio en las condiciones experimentales establecidas. Se observó una reducción de las cantidades del complejo proteína-ADN en función del incremento de las dosis de EDL utilizadas. De manera significativa, la preparación de EDL a 2,5 U/mL inhibe completamente la activación de NF-κB luego de 7 días de tratamiento del cultivo de MT-4 (Figura).

1. González E, Díaz de la Rocha A, Sagaró B, Fernández-Ortega C. Valor terapéutico del factor de transferencia en el herpes simple. Estudio a doble ciegos. *Biotecnología Aplicada* 1993;10:2-3.

2. Cabezas R, Estrada S, Padierna L, Ysla R, Díaz de la Rocha A, Sagaró B, et al. Effects of DLE in patients with herpes. En: Xue Yuan (Ed.) *Research and application of transfer factor and DLE*. Beijing; 1989:294-307.

3. May MJ, Gosh S. Signal transduction through NF-κB. *Immunology Today* 1998;19:80-8.

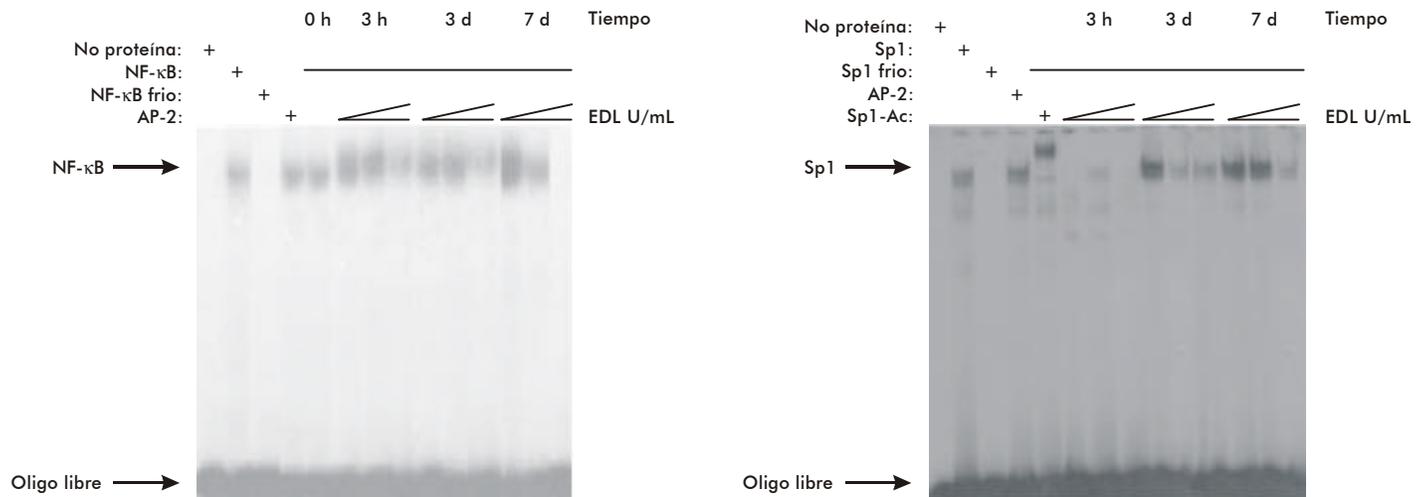


Figura 1. Capacidad de la preparación de EDL de inhibir la actividad de unión a secuencias específicas de ADN de los factores transcripcionales NF-κB y Sp1 en la línea celular MT-4. Las células se cultivaron en presencia o ausencia de diferentes dosis de EDL (0, 1,25 y 2,5 U/mL) durante 7 días. Los extractos nucleares de cada punto experimental (0 h, 3 h, 3 y 7 días) se incubaron con el oligonucleótido específico marcado con (γ - P^{32}) ATP. Los complejos de unión proteína-ADN se separaron en un gel de poliacrilamida al 6%. La reducción de la formación del complejo NF-κB-ADN es de manera dosis dependiente y se incrementa en función del tiempo del cultivo celular en presencia de EDL. Es de destacar que el producto EDL a una dosis de 2,5 U/mL inhibe completamente la activación del factor transcripcional NF-κB luego de 7 días de cultivo de las células MT-4. De igual forma, se observa un efecto inhibitorio sobre la formación del complejo Sp1 a los 7 días de cultivo celular en presencia de EDL.

Efecto inhibitorio de la preparación de EDL sobre la actividad del factor transcripcional Sp1

Se ha reportado que delecciones en ambos elementos NF- κ B del LTR del VIH pueden afectar seriamente la capacidad replicativa del VIH en diferentes tipos celulares. Un requisito fundamental para la replicación del virus carente de secuencias de unión para NF- κ B, es la presencia de los tres elementos Sp1. Por otra parte, la eliminación simultánea de todos los sitios de unión tanto para NF- κ B como Sp1 resulta en un provirus incapaz de replicarse en células CD4⁺ humanas [4]. Teniendo en cuenta estos elementos, nosotros estudiamos el efecto del producto EDL sobre la actividad Sp1 en las células MT-4.

Los resultados muestran una modificación de la actividad de unión de Sp1 en las células linfoblastoides tratadas con EDL. Como se puede apreciar, el efecto de inhibición por EDL se incrementa en función de la dosis utilizada así como en tiempos prolongados de cultivo. Luego de tres días de cultivo, se aprecia el complejo de unión Sp1-ADN en las células no tratadas; sin embargo, el tratamiento del cultivo celular con dosis crecientes de EDL está directamente relacionado con la disminución de la actividad de unión Sp1 en los extractos nucleares de las células tratadas con EDL. Transcurridos 7 días de cultivo en presencia de EDL, se recupera la actividad constitutiva de Sp1 en presencia de dosis menores de EDL, pero no en aquellas células tratadas con elevadas dosis de la preparación de EDL. Para la identificación de proteínas Sp1 en los complejos proteína-ADN, se incubaron previamente los extractos nucleares de MT-4 con oligonucleótidos específicos para Sp1 (Figura).

La preparación de EDL no afecta la actividad de unión de AP-1 en células MT-4

Para demostrar la especificidad del efecto supresor de EDL sobre los factores transcripcionales esenciales para la expresión génica del VIH, se realizaron experimentos similares para determinar la actividad de unión del factor AP-1 en células MT-4 tratadas con EDL. Los extractos nucleares de los diferentes puntos experimentales analizados en los ensayos de retardación en gel, no mostraron afectación alguna de la actividad transcripcional AP-1 en presencia de las diferentes dosis de EDL empleadas.

La preparación de EDL no afecta la transcripción de los genes p65NF- κ B e I κ B α en células MT-4

La activación del sistema NF- κ B se controla a distintos niveles de regulación. Diferentes estudios indican la necesidad de un nivel basal de la proteína inhibitoria I κ B α capaz de inhibir completamente al factor NF- κ B, y además demuestran niveles elevados de transcritos de I κ B α en células que expresan la subunidad transactivadora RelA(p65) de NF- κ B [5]. Mediante técnicas de RT-PCR se analizó la expresión de los genes p65 NF- κ B e I κ B α en células MT-4 cultivadas en presencia de EDL. Se observaron cantidades similares del producto amplificado de los genes p65 NF- κ B e I κ B α en células MT-4 tanto tratadas como no tratadas con EDL. Los resultados experimentales indican que el efecto inhibitorio del EDL sobre NF- κ B en células MT-4, no está mediado por una regulación del balance RelA-I κ B α nivel transcripcional.

Conclusiones

Estos datos contribuyen a esclarecer nuestras observaciones previas [6, 7]. En presencia de concentraciones de VIH elevadas, el EDL provocó una reducción superior a 70% de la cantidad de antígeno p24 presente en los sobrenadantes de cultivo de MT-4. Por otra parte, la disminución de la actividad NF- κ B en células MT-4 luego de períodos cortos de tratamiento puede ser funcionalmente relevante para la inhibición de la producción de TNF α inducida por lipopolisacáridos (LPS) bacterianos, observada en condiciones de pre-tratamiento o incubación simultánea con EDL, tanto en leucocitos de sangre periférica como en cultivos de sangre total de individuos sanos.

Estos resultados contribuyen a la caracterización y definición de los mecanismos moleculares que median las disímiles actividades biológicas del producto EDL. El primer reporte de la capacidad de un producto natural de origen humano como el EDL [8], de inhibir la actividad del factor transcripcional NF- κ B, puede tener grandes implicaciones para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas utilizando nuestra preparación de EDL en enfermedades como infecciones severas, shock séptico y en la infección por VIH.

4. Chung RF, Semmes OJ, Neuveut C, Jeang KT. Modulation of Sp1 phosphorylation by human immunodeficiency virus type 1 Tat. *J Virol* 1998;72:2615-29.

5. Sun SC, Elwood J, Béraud C, Green WC: Human T-cell leukemia virus type 1 Tax activation of NF- κ B/Rel involves phosphorylation and degradation of I κ B α and RelA (p65)-mediated induction of the c-rel gene. *Mol Cell Biol* 1994;14:7377-84.

6. Fernández-Ortega C, Dubet M, Ruibal I, Vilarrubia OL, Menéndez de San Pedro JC, Navea L, Ojeda M, et al. Inhibition of *in vitro* HIV infection by dialysable leucocyte extracts. *Biotherapy* 1996;9:33-40.

7. Ojeda M, Fernández-Ortega C, Araña MJ. Dialyzable Leucocyte Extract (DLE) reduces lipopolysaccharide-induced tumour necrosis factor secretion in human leucocytes. *Biotherapy* 1996;9:163-70.

8. Ojeda M, Fernández-Ortega C, Araña MJ. Dialyzable leucocyte extract suppresses the activity of essential transcription factors for HIV-1 gene expression in unstimulated MT-4 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;273:1099-103.

Caracterización físico-química e inmunobiológica del antígeno de superficie recombinante del virus de la hepatitis B (AgsHB) obtenido en forma de agregados por cromatografía de exclusión molecular de alta resolución (SEC)

Dina Tleugabulova,¹ Viviana Falcón Cama,² Eduardo Pentón Arias,² Julio Aguilar Rubido,² Eduardo Martínez Díaz,² Minerva Sewer Mensiés¹

¹Biocen. Bejucal, La Habana, Cuba.

²Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. Ave. 31 entre 158 y 190, Cubanacán, Playa, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 21 4764. E-mail: eduardo.penton@cigb.edu.cu

Introducción

Los estudios controlados y la experiencia internacional de más de 10 años de aplicación masiva, han demostrado que la vacuna basada en el AgsHB es efectiva y segura para la prevención de la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) [1]. Algunos intentos realizados para extender el uso de la vacuna a la terapéutica de la enfermedad han producido resultados favorables, pero aún por debajo de las expectativas [2-4]. Por otra parte, un 5-10% de los vacunados, la inmunidad no se logra debido a factores genéticos [5-7] o de otro tipo [8-10]. El presente estudio tiene como propósito la caracterización de variantes antigénicas capaces de lograr una respuesta más rápida y eficiente, reclutar efectores celulares del sistema inmune como los linfocitos T citotóxicos, intensificar la inmunogenicidad del AgsHB y ampliar el rango de sus aplicaciones hacia el terreno terapéutico.

Caracterización físico-química

El AgsHB recombinante producido en levadura está compuesto por unas 100-130 subunidades de la proteína S (monómero del AgsHB), las cuales se ensamblan de forma espontánea con lípidos de la pared celular de la levadura para dar lugar a partículas inmunogénicas de 22 nm de diámetro como promedio [1]. En la actualidad, la estructura tridimensional detallada del AgsHB no es conocida, la hidrofobicidad, resistencia a la hidrólisis enzimática y el alto contenido de lípidos dificultan la aplicación de estrategias convencionales para la caracterización físico-química del AgsHB [11].

Debido a las dificultades señaladas, se desarrolló una vía alternativa para la caracterización del AgsHB que consistió en el fraccionamiento de la preparación del antígeno purificado en una columna preparativa de SEC y el análisis de las fracciones por una batería de técnicas físico-químicas e inmunoquímicas, tales como SEC en modo analítico, microscopía electrónica, electroforesis, inmunoensayo e inmunofluorescencia (análisis multidimensional). El conjunto de datos provenientes de estos diferentes métodos analíticos fue interpretado de forma integral [12, 13], mediante un enfoque novedoso que puede ser generalizado al análisis de otras subpartículas virales.

La aplicación de este enfoque multidimensional permitió demostrar la existencia de una fracción minoritaria del antígeno con modificaciones en el enlace por puentes disulfuro, que aunque no afectan el ensamblaje y la antigenicidad del AgsHB, sí contribuyen a la

heterogeneidad molecular y, en consecuencia, al ensanchamiento del pico correspondiente al AgsHB en el perfil cromatográfico en SEC [14].

Se desarrolló un método SEC en condiciones desnaturalizantes, el cual se convirtió en la principal herramienta de trabajo para la optimización de las condiciones de reducción del AgsHB [15], la detección de productos de degradación [13], el análisis del antígeno oxidado *in vitro* [16] y el análisis del antígeno desadsorbido del gel de hidróxido de aluminio [17].

La combinación del análisis cromatográfico y electroforético del antígeno desadsorbido del gel de hidróxido de aluminio con la visualización directa del antígeno adsorbido por microscopía electrónica de transmisión e inmunomicroscopía [17], permitió probar experimentalmente una hipótesis previamente sustentada por otros autores sobre una posible desnaturalización del antígeno después de su adsorción sobre el gel de hidróxido de aluminio [18].

El resultado de mayor relevancia científica y práctica fue la identificación de estructuras supramoleculares compuestas por un número variable de partículas del AgsHB aparentemente intactas en el interior de la célula de la levadura, y la caracterización físico-química de estos agregados [19]. Se demostró que más de 40% del AgsHB en el extracto crudo de la levadura *P. pastoris* transformada para la producción de este antígeno se encuentra en forma agregada. Agregados similares fueron anteriormente aislados del extracto crudo por ultracentrifugación en gradientes de sacarosa [20].

Caracterización inmunobiológica

La demostración experimental de que los agregados del AgsHB son capaces de inducir en ratones una respuesta inmune superior a la del antígeno nativo, constituye un antecedente válido para explorar la posibilidad de su uso en el desarrollo de una nueva vacuna para las formas crónicas de la hepatitis B. Esta expectativa se basa en que la variante antigénica agregada posee una capacidad de promoción de hipersensibilidad retardada (DTH) en el ratón significativamente superior a la del antígeno no agregado.

Como se ha reportado el reclutamiento y la inducción de actividad de linfocitos T citotóxicos (CTL) por las proteínas agregadas [21], y se conoce también que esta actividad está vinculada a la eliminación de los hepatocitos infectados por el VHB [22], estos

1. Pentón E, Muzio V, González-Griego M. The Hepatitis B Virus (HBV) infection and its prevention by a recombinant-DNA viral surface antigen (rec- HBsAg) vaccine. *Biotecnología Aplicada* 1994; 11:1-11.

2. Hervas-Stubbs S, Lasarte JJ, Sarobe P, Prieto J, Cullen J, Roggendorf M, Borrás-Cuesta F. *J Hepatol* 1997;27:726-37.

3. Pol S, Couillin I, Michel M, Driss F, Nalpas B, Carnot F, Berthelot P, Brechot C. Immunotherapy of chronic hepatitis B by anti-HBV vaccine. *Acta Gastroenterol Belg* 1998;61:228-33.

4. Akbar SM, Kajino K, Tanimoto K, Kurose K, Masumoto T, Michitaka K, Horiike N, et al. Placebo-controlled trial of vaccination with hepatitis B virus surface antigen in hepatitis B virus transgenic mice. *J Hepatol* 1997;26:131-7.

5. Alper CA, Krunskall MS, Marcus-Bagley D, Craven DE, Katz AJ, Brink SJ, et al. Genetic prediction of nonresponse to hepatitis B vaccine. *N Engl J Med* 1989;321:708-12.

6. Egea E, Iglesias A, Salazar M, Morimoto C, Krunskall MS, Awdeh Z, et al. The cellular basis for lack of antibody response to hepatitis B vaccine. *J Exp Med* 1991;173:531-8.

7. Averhoff F, Mahoney F, Coleman P, Schatz G, Hurwitz E, Margolis H. Immunogenicity of hepatitis B Vaccines. Implications for persons at occupational risk of hepatitis B virus infection. *Am J Prev Med* 1998;15:1-8.

8. Stevens CE, Alter HJ, Taylor PE, Zang EA, Harley EJ, Szmunes W. Hepatitis B vaccine in patients receiving hemodialysis: immunogenicity and efficacy. *N Engl J Med* 1984;311:496-501.

9. Degos F, Duhamel G, Brechot C, Nalpas B, Courouze AM, Tron F, et al. Hepatitis B vaccination in chronic alcoholics. *J Hepatol* 1986;2:402-9.

10. Nagaraju K, Naik SR, Naik S. Lack of *in vitro* lymphoproliferative response to hepatitis B surface antigen in healthy vaccine recipients. *Indian J Med Res* 1998;108:80-4.

11. Hemling ME, Carr SA, Capiou C, Petre J. Structural characterization of recombinant hepatitis B surface antigen protein by mass spectrometry. *Biochemistry* 1988;27:699-705.

12. Tleugabulova D, Reyes J, Costa L, Diaz J, Madraza-Piñol JJ. Size exclusion chromatography of recombinant hepatitis B surface antigen particles. *Chromatographia* 1997;45:317-20.

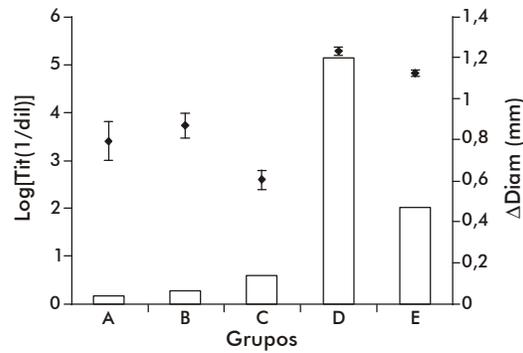
hechos pueden explicar, total o parcialmente, la mayor inmunogenicidad de la vacuna Heberbiovac HB, demostrada en numerosos ensayos clínicos dentro y fuera del país [1], debido a su contenido de antígeno agregado.

Por último, como se dispone de evidencias de que existe una respuesta inmune humoral contra el AgsHB agregado significativamente superior que la del antígeno no agregado, se puede suponer que el antígeno agregado podría comportarse también como un mejor inmunógeno en el humano y proporcionar una vacuna de mayor calidad.

En el gráfico precedente se puede apreciar que la respuesta inmune humoral generada por el antígeno agregado fue significativamente superior a la generada por el antígeno nativo, tanto adsorbidos en alúmina por vía intramuscular (grupos D y E) como inoculados por vía intranasal en PBS (grupos A y C) ($p < 0,05$).

En el estudio de agregación del AgsHB inducido *in vitro* por el estrés oxidativo [16], se plantea por primera vez una posible oxidación del AgsHB por radicales libres en las células vivas. Esta posibilidad no se había considerado antes a pesar de la evidencia clínica documentada sobre el estrés oxidativo y una elevada peroxidación lipídica en pacientes con hepatitis B crónica [23]. La oxidación del AgsHB viral pudiera ser la causa principal de la formación de agregados plasmáticos *in vivo*, los cuales pudieran desencadenar mecanismos patogénicos en el organismo no descritos hasta ahora. Esta última hipótesis está en vías de desarrollo actualmente.

Aunque en su estado actual de desarrollo este trabajo no reivindica aportes económicos directos, los



A: Antígeno agregado 5 mg en PBS, vía intranasal
 B: Antígeno agregado 10 mg en PBS, vía intranasal
 C: Antígeno nativo 5 mg en PBS, vía intranasal
 D: Antígeno agregado 5 mg adsorbido sobre alúmina, vía intramuscular
 E: Antígeno nativo 5 mg adsorbido sobre alúmina, vía intramuscular

Figura. Estudio comparativo de la respuesta de anticuerpos anti-AgsHB y de hipersensibilidad retardada -DTH- en ratones, obtenida por inmunización con las formas nativa y agregada del AgsHB.

resultados del presente estudio contribuyeron a la decisión de no utilizar la microscopía electrónica para el control rutinario del AgsHB y se optimizó la recolección del AgsHB durante la purificación preparativa por SEC, lo que condujo a la eliminación de rechazos del producto por concepto de pureza [24]. Estas mejoras contribuyen de modo indirecto a una reducción del costo de la producción.

13. Tleugabulova D, Falcón V, Pentón E. Physico-chemical characterization of recombinant hepatitis B surface antigen by multidimensional approach. J Chromatography A, Symposium, 1999.

14. Tleugabulova D. Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis of recombinant hepatitis B surface antigen particles. J Chromatography B (biomedical applications) 1998;707:267-73.

15. Tleugabulova D. Size-exclusion chromatographic study of the reduction of recombinant hepatitis B surface antigen, published in Journal of Chromatography B (biomedical applications) 1998;713:401-7

16. Tleugabulova D, Falcón V, Pentón E. Aggregation of recombinant hepatitis B surface antigen induced *in vitro* by oxidative stress, Journal of Chromatography B (biomedical

applications), manuscrito aceptado, 1999.

17. Tleugabulova D, Falcón V, Pentón E. Evidence for the denaturation of recombinant hepatitis B surface antigen on aluminium hydroxide gel, Journal of Chromatography B (biomedical applications) 1998;720:153-63.

18. Sedlik C, Saron MF, Sarraseca J, Casal I, Leclerc C. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94:7503-12.

19. Tleugabulova D, Falcón V, Sewer M, Pentón E. Aggregation of recombinant hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*, Journal of Chromatography B (biomedical applications) 1998;716:209-19.

20. Martínez E, Santana H, Borges M. Study of the aggregation level of HBsAg obtained by the Cuban technology, Avances en Biotecnología Moderna, Vol. 4, p.7, 1997.

21. Speidel K, Osen W, Faath S, Hilgert I, Obst R, Braspenning J, Momburg F, Hammerling JG, Rammensee HG. Priming of cytotoxic T lymphocytes by five heat-aggregated antigens *in vivo*: conditions, efficiency and relation to antibody responses. European J Immunol 1997;27:2391-9.

22. Chisari FV. Hepatitis B virus immunopathogenesis. Ann Rev Immunol 1995;13:29-60.

23. Nisevich NI, Uchaikin VF, Moleva TP. Significance of lipid peroxidation processes in the cytotoxic syndrome in viral hepatitis in children. Pediatría 1978;6:44-8.

24. Tleugabulova D, Herrera I, Borrego Y. Optimización del proceso de purificación del antígeno recombinante de superficie del virus de la hepatitis B por gel filtración. Premio destacado en el XI Forum de Ciencia y Técnica, 1996.

Contribución al diagnóstico de algunas infecciones oportunistas en el paciente inmunocomprometido

Sonia Resik,¹ Vivian Kourí,¹ Yudira Soto,¹ Belsy Acosta,¹ Carlos Suárez,¹
Serafina García,¹ Mayra Muné,¹ María E Rodríguez,¹ Antonio Enamorado,²
Luis Morier,¹ Lissette Pérez¹

¹Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kourí" (IPK). Autopista Novia del Mediodía, km 6, La Lisa, Ciudad de La Habana, Cuba. Fax: (53-7) 24 6051; E-mail: sresik@ipk.sld

²Instituto de Nefrología "Abelardo Busch". Ave. 26 y Ave. Independencia, Cerro, Ciudad de La Habana, Cuba.

Introducción

La necesidad del diagnóstico rápido y exacto de las enfermedades virales oportunistas se ha incrementado dramáticamente durante las últimas décadas, debido al uso creciente de drogas inmunosupresoras en la práctica médica, al descubrimiento del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), y al progreso en las investigaciones sobre las terapias antivirales. El paciente inmunocomprometido sufre un gran número de infecciones oportunistas.

Para un mejor manejo clínico y terapéutico de este tipo de pacientes, es preciso contar con herramientas útiles para el diagnóstico temprano y acertado de tales infecciones. Desde hace cinco años se continúan desarrollando líneas de investigación para asimilar tecnologías de diagnóstico avanzado: una reacción en cadena de la polimerasa (RCP) múltiple para todos los herpesvirus: VHS1 y 2, VEB, CMV, VVZ, HVH6, HVH7, HVH8, y una RCP para la detección y la tipificación de *Chlamydia trachomatis* y Papilomavirus.

Meningoencefalitis por los virus de la familia Herpesviridae

El aislamiento viral a partir del líquido cefalorraquídeo (LCR) es una técnica poco sensible para lograr el diagnóstico etiológico de las meningoencefalitis causadas por herpesvirus. Por ello, recientemente, se ha reportado el uso de la técnica de RCP para la detección e identificación de los diversos herpesvirus en pacientes con meningoencefalitis. Se introdujo una RCP múltiple que permite detectar todos los herpesvirus en un mismo tubo de reacción para el estudio de los LCR de pacientes con diagnóstico clínico de encefalitis o meningoencefalitis aguda o subaguda de probable etiología herpética y que fueron recibidos en el laboratorio de ETS del Departamento de Virología del IPK a partir 1996. De estos LCR, 182 correspondían a pacientes adultos seropositivos al VIH. El 22,5% de estos LCR resultaron positivos y el virus más frecuentemente encontrado fue el citomegalovirus (CMV) (13,7%), aunque en otras muestras se pudieron detectar otros herpesvirus (VZV, EBV, HVH6). También se constató la ocurrencia de infecciones múltiples en un mismo paciente. Este trabajo es de gran importancia para nuestro país, debido a que constituye el primer estudio etiológico de meningoencefalitis producidas por todos los herpesvirus. Además, permitió demostrar la sensibilidad superior de la técnica de RCP como herramienta rápida y efectiva para el diagnóstico molecular de esta entidad. El hecho de poder hacer el diagnóstico de los diferentes herpesvirus en una sola reacción de am-

plificación, ha permitido brindar un resultado en 24 h. De esta manera, se ha podido instaurar a tiempo la terapéutica específica, evitando así las secuelas y en muchos casos la muerte.

Monitoreo de la infección causada por herpesvirus en el paciente con trasplante de riñón

El trasplante renal constituye, en la actualidad, la herramienta terapéutica más eficaz para el tratamiento de la insuficiencia renal crónica en fase terminal. El rechazo al injerto y las infecciones constituyen las barreras más importantes para alcanzar el éxito del trasplante. Los herpesvirus, y fundamentalmente el CMV, constituyen los agentes virales que más se han reportado como causantes de morbilidad en este tipo de pacientes. Se realizó un estudio de prevalencia de anticuerpos contra los herpesvirus en la población de los pacientes hemodializados del Instituto de Nefrología, cantera de los trasplantes renales, y se detectó que 100% de ellos tenía anticuerpos contra CMV y herpes simple (VHS), 95% contra el virus Epstein-Barr (VEB). Ninguno de estos pacientes era seropositivo al herpesvirus humano 8 (HVH8). Un grupo de trasplantados fue estudiado de forma evolutiva durante 16 semanas para hacer un seguimiento de la infección por herpesvirus. Se realizó el aislamiento de CMV a partir de orina, y una RCP múltiple para detectar genoma de los herpesvirus en plasma. Cincuenta y ocho por ciento de los pacientes resultaron positivos a la infección por CMV y 28% de este grupo mostró evidencias clínicas de enfermedad. El mayor número de pacientes con la infección por CMV se detectó entre la cuarta y la duodécima semana después del trasplante. De los individuos sometidos a una inmunosupresión alta, en 70% se puso de manifiesto la infección por CMV. Cincuenta por ciento del total de los pacientes en algún momento de su evolución clínica desarrolló episodios de rechazo al injerto, y en 83,3% de éstos la infección por CMV pudo ser diagnosticada, aunque la pérdida del órgano injertado o de la función renal en un período no mayor de un año posterior al trasplante, no pudo ser evitada. La RCP detectó las infecciones dos semanas antes que el aislamiento viral. Por primera vez en Cuba se confirma la infección por el herpesvirus humano 6 (HVH6) en este tipo de pacientes.

Detección de ADN del HVH8 en pacientes cubanos con sarcoma de Kaposi (SK) asociado al SIDA. Estudio de seroprevalencia HVH8 en diferentes grupos de la población cubana

Después del advenimiento del SIDA, el SK se ha convertido en la neoplasia más frecuente que desarrollan los pacientes con este síndrome. El SK aparece en 15 a 20% de ellos; sin embargo, raramente se observa en individuos inmunocompetentes. En el año 1994, Chang y colaboradores reportaron la identificación de secuencias de ADN similares a las de los herpesvirus, en tejidos de SK de pacientes con SIDA. El virus así descubierto se denominó virus del herpes humano 8 (HVH8) o herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi. En nuestro país, en los tres últimos años se ha venido observando un incremento en la aparición de casos de SK en los pacientes con SIDA (Departamento de Anatomía Patológica del IPK).

Se conoce muy poco acerca de la prevalencia y la distribución de la infección por el HVH8 en el Caribe. Para determinar la prevalencia de anticuerpos contra el HVH8 se estudiaron muestras de suero de 377 sujetos con alto y bajo riesgo de infecciones por el VIH y el HVH8. Entre los 25 pacientes con VIH y SK, 17 (68%) fueron seropositivos al HVH8. Treinta y dos de 154 (20,7%) pacientes seropositivos al VIH, pero sin SK, fueron también seropositivos al HVH8. En nuestro país, la detección de anticuerpos contra el HVH8 no estuvo asociada con las prácticas homobisexuales, porque estos anticuerpos se hallaron en gran parte de un grupo de individuos heterosexuales de ambos sexos que habían adquirido el VIH en África. Niveles muy bajos de anticuerpos contra el HVH8 fueron observados en donantes de sangre (1%), y no se encontraron en los receptores de trasplante renal.

Además, con el objetivo de demostrar la frecuencia de detección del HVH8 en los individuos con SK, se decidió emplear la técnica de RCP para estudiar las biopsias y las autopsias de un gran número de los pacientes con SK y SIDA diagnosticados en Cuba. Se procesaron 42 muestras de tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina, pertenecientes a 25 pacientes, tomadas a lo largo de un período de 8 años (desde el año 1991 hasta 1998), y 13 sueros provenientes de mismo tipo de pacientes. Se incluyeron también en el presente estudio 10 lesiones de piel embebidas en parafina, derivadas de otras patologías dermatológicas no relacionadas con el SK y obtenidas de pacientes sin SIDA. Se logró detectar el ADN del HVH8 en 100% de los casos de SK estudiados, y no se detectó en las lesiones de piel no relacionadas con el SK. Por primera vez en Cuba se estableció el diagnóstico etiológico del SK en pacientes cubanos con esta neoplasia.

Prevalencia de *Chlamydia trachomatis* en mujeres infectadas con el VIH en Cuba

Se determinó la prevalencia y la distribución de las serovariedades de *Chlamydia trachomatis* (*Ct*) en 60 mujeres cubanas seropositivas al VIH. El genoma de *Ct* se detectó mediante una RCP que usa cebadores específicos de secuencia complementaria al gen de la proteína mayor de la membrana externa de *Ct*. Un por ciento de las muestras que resultaron positivas por RCP fue subsiguientemente sujeto a genotipificación, mediante el análisis por restricción enzimática del producto amplificado. El por ciento de prevalencia detectado fue de 10%, superior al compararlo con el del grupo control que fue de 6,6%. La serovariedad E fue la más frecuen-

temente detectada. Las mujeres con *Ct*, seropositivas al VIH, mostraron inflamación pélvica (EIP) como principal manifestación clínica (83,3%), seguida por cervicitis (50%). El presente estudio es el primer reporte en Cuba de prevalencia de *Ct* en mujeres infectadas por el VIH.

Estudio *in vitro* de la sensibilidad y la resistencia de cepas de herpes simple al Aciclovir y al Foscarnet

En la actualidad se dispone de una variedad de nuevos agentes antivirales, entre cuyas características principales se revelan su escasa toxicidad y su gran selectividad para el tratamiento de las infecciones producidas por el herpes simple. Sin embargo, el uso desmedido de estos compuestos ha conducido a la aparición de mutantes resistentes, fundamentalmente en pacientes inmunocomprometidos. Debido a la emergencia de tales mutantes, los ensayos de susceptibilidad antiviral *in vitro* han adquirido gran importancia.

Mediante un ensayo de reducción del efecto citopático en cultivo de células, se estudió la sensibilidad y la resistencia al Aciclovir y al Foscarnet, de 103 cepas del VHS aisladas entre 1992 y 1997 en el laboratorio de Enfermedades de Transmisión Sexual (Virología) del IPK. No se encontraron cepas resistentes al Foscarnet. Para 10,7% de las cepas se demostró su resistencia al Aciclovir y esta resistencia fue estadísticamente significativa para los pacientes seropositivos al VIH, en comparación con los seronegativos. La resistencia del VHS 2 fue estadísticamente significativa al compararla con la del VHS 1. Por primera vez en Cuba se confirma la presencia de cepas de herpes simple resistentes al Aciclovir, lo que alerta un cambio en la política de uso de estos antivirales fundamentalmente para el tratamiento de enfermedades en el paciente inmunocomprometido.

Infecciones por Papilomavirus humano en pacientes inmunocomprometidos

Las infecciones producidas por papilomavirus humano (PVH) se han convertido en un problema de salud mundial, principalmente en pacientes inmunocomprometidos. La mayor parte de los genotipos de PVH con alto potencial oncogénico se ha visto asociada, en estos pacientes, a procesos neoplásicos localizados en los tractos orofaríngeo y anogenital donde constituyen causa de tumores de rápida y fatal evolución.

En el presente trabajo se determinó la prevalencia de PVH en mujeres cubanas seropositivas al VIH, analizándose 60 muestras endocervicales mediante la técnica de RCP. La tipificación de los casos positivos se realizó utilizando un protocolo de hibridación no radioactiva (quimioluminiscencia ampliada) que permite detectar hasta 40 tipos diferentes de PVH. Se detectaron 33 muestras positivas para una prevalencia de 55%, que al compararlo con 23% de prevalencia en el grupo control estudiado resulta ser significativamente superior. Por primera vez en nuestro país se determina la prevalencia de infección por PVH en mujeres seropositivas al VIH, y se logra identificar tipos de PVH de muy alto potencial oncogénico y muy poco frecuentes en personas inmunocompetentes. Se describe

coinfección con hasta siete tipos de PVH diferentes en una misma paciente.

También como parte de este estudio, se analizaron mediante RCP 40 muestras de tumores laríngeos embudados en parafina procedentes de pacientes atendidos en servicios de oncología. Se detectó PVH 16 en 50% de los casos. Las lesiones tumorales detectadas en estos casos positivos fueron clasificadas anatómopatológicamente como carcinomas escamosos típicos y en todos estos pacientes se describen los antecedentes de consumo de alcohol y tabaquismo. Estos resultados aportan conocimiento acerca de los tipos de PVH que están circulando en este grupo de pacientes inmunocomprometidos, lo cual resulta novedoso en el país. Además, la detección de este agente en procesos neoplásicos reviste gran importancia con el fin de orientar conductas de prevención, control y tratamiento. Es por ello que la utilización de técnicas de avanzada para la detección y tipificación viral constituyen herramientas diagnósticas de gran valor para la orientación adecuada de las terapias clínicas y antivirales.

Conclusiones

Se realiza por primera vez el diagnóstico etiológico del sarcoma de Kaposi, así como un estudio de seroprevalencia de un nuevo herpesvirus (HVH8) en diferentes grupos de la población cubana. Se describe, por primera vez, en los pacientes cubanos con trasplante de riñón, la relación entre la infección por CMV, los episodios de rechazo al trasplante y la pérdida del órgano trasplantado. Se realizan, por primera vez en Cuba, los estudios de prevalencia de la infección por *Chlamydia trachomatis* y de la infección por papilomavirus, en pacientes seropositivos al VIH. Se detectan, por primera vez en el país, diferentes herpesvirus como los agentes etiológicos de meningoencefalitis, así como infecciones herpéticas múltiples del sistema nervioso central. Se confirma por primera vez la presencia de cepas de herpes simple resistentes al Aciclovir. Contar con un diagnóstico rápido y altamente sensible permite dar una respuesta diagnóstica efectiva, que redundará en una mejoría en la calidad de la vida del paciente inmunocomprometido y asegura la imposición de un tratamiento antiviral adecuado.

El CIGBy la red *EMBnet* le invitan a participar en este **III Taller Introductorio de Bioinformática** dirigido tanto a investigadores en Biología Molecular como a especialistas en Computación que comiencen a familiarizarse con la Bioinformática y específicamente con el **análisis de secuencias de ácidos nucleicos y proteínas**.

El taller constará de conferencias teóricas y clases prácticas, para las cuales habrá un aula equipada de tal manera que se puedan realizar tareas concretas para la asimilación y entrenamiento de los temas impartidos.

No se requiere de conocimiento previo sobre los temas que se abordarán, pero si sería de gran ayuda el estar familiarizado con el uso del Windows 9X/NT.

Han confirmado su participación los profesores Thure Etzold (EBI-Lion Bioscience, UK), Rodrigo Lopez (EBI, UK), María Elena Ochagavía (CIGB, Cuba) y Ricardo Bringas (CIGB, Cuba).

2001 Bioinformática

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología
13 al 17 de agosto del 2001

Temáticas

- Recuperación de información de bancos de datos de secuencias
 - Programa SRS
- Búsquedas de similitud en bancos de datos de secuencias de ADN y proteínas
 - Programas FASTA y BLAST
- Alineamiento múltiple de secuencias
 - Programa CLUSTALW
- Construcción de árboles filogenéticos
 - Programa PHYLIP
- Recursos de Bioinformática en INTERNET
- Los nuevos retos de la Bioinformática

Contacto

Oday Vivian Pulido
Dirección de Información, CIGB
Apartado 6162, La Habana, Cuba
Teléfonos: (53-7) 218200, 216332
Fax: (53-7) 218070, 336008
E-mail: bioinformatica@cigb.edu.cu
URL: <http://bio.cigb.edu.cu>



Nuevas herramientas en proteómica: obtención de una alta cobertura de secuencia mediante digestión de proteínas en geles de electroforesis en poliacrilamida de tipo IEF-CA, IEF-IPG y SDS

Lila Castellanos Serra, Luis Javier González, Eugenio Hardy, Vivian Huerta

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, AP 6162, CP 10600, Ciudad de La Habana, Cuba.
E-mail: lila.castellanos@cigb.edu.cu

Introducción

Las técnicas más modernas de identificación de proteínas en muestras biológicas complejas, utilizan la separación por electroforesis seguida de la digestión de las proteínas de interés con proteasas específicas. La mezcla de péptidos obtenida se analiza a continuación por espectrometría de masas. Generalmente las digestiones de proteínas en geles verifican una parte de la secuencia (20%-40% son valores de cobertura de secuencia habituales obtenidos por este método). Esto es suficiente para la identificación de proteínas mediante búsqueda en bancos de datos. Sin embargo, cuando el propósito es identificar modificaciones postraduccionales o identificar mutaciones o variantes de una proteína, es necesario obtener coberturas de secuencias mucho mayores, que se acerquen lo más posible a la secuencia total de la proteína. Este es un problema técnicamente complejo. Para poder lograrlo se hace necesario la optimización de un conjunto de factores, cada uno de los cuales contribuye desde su parte al éxito o al fracaso de la estrategia global. El presente trabajo a) propuso una solución a este problema mediante el aumento del porcentaje de cobertura de secuencia en geles de SDS a valores muy altos, equivalentes a los logrados en digestiones en solución, b) extendió las digestiones a geles de focalización isoelectrica (IEF) en anfolinas portadoras (CA) y en inmobilinas (IPG), y c) permitió acoplar de una manera novedosa las electroforesis desnaturalizante y de IEF como vía de resolución de las mezclas de proteínas que comigran en una misma talla molecular en geles de SDS.

Métodos desarrollados

1. Un procedimiento de digestión de proteínas en geles de SDS seguido del recobrado de péptidos, que ha permitido obtener coberturas de secuencias muy altas (por ejemplo, a partir de 0,5 µg de estreptoqui-

nasa recombinante, 98,8% de cobertura; para la eritropoyetina, 91% de cobertura). Estos resultados son comparables a los logrados en digestiones en solución con cantidades de material mucho mayores.

2. Un nuevo procedimiento de digestión para las proteínas en geles de IEF-CA e IEF-IPG. Fue posible encontrar condiciones para eliminar las anfolinas portadoras que al mismo tiempo permitan una eficiente digestión de las proteínas dentro de las bandas de gel. La técnica permite analizar por espectrometría de masas las digestiones obtenidas en geles de focalización isoelectrica.

3. Un nuevo procedimiento para el reanálisis de proteínas contenidas en bandas de geles de SDS por electroforesis en geles de IEF e IPG.

Estos resultados se integran en un método que permite la identificación de proteínas por espectrometría de masas a partir de separaciones en geles de focalización isoelectrica, utilizando esta técnica como una segunda dimensión de separación tras la resolución inicial de geles de SDS.

Conclusiones

La combinación de estos elementos tecnológicos ha permitido diseñar un protocolo de digestión de proteínas de alta eficiencia y un procedimiento para el reanálisis de proteínas separadas en geles de SDS mediante un segundo principio, en este caso la focalización isoelectrica. Estos procedimientos se han aplicado con éxito a la identificación de interleucina 6 [1], estreptoquinasa y eritropoyetina [2] y de las modificaciones postraduccionales (sitios de fosforilación) de la oncoproteína 18 (stathmina) [3]. Actualmente la tecnología desarrollada para el reanálisis de proteínas separadas en geles de SDS por focalización isoelectrica está siendo utilizada en la identificación de proteínas naturales.

1. Castellanos-Serra L, Proenza W, Huerta V, Moritz RL, Simpson RJ. Proteome analysis of polyacrylamide gel-separated proteins visualized by reversible negative staining using imidazole-zinc salts. *Electrophoresis* 1999;20:732-7.

2. Castellanos-Serra L, Hardy E, Proenza W, Huerta V, González LJ, Le Caer JP, et al. Reversible negative staining of protein on electrophoresis gels by imidazole-zinc salts: micropreparative applications to proteome analysis by mass spectrometry. En: RM Kamp, D Kyriakidis, T Choli-Papadopoulou (Eds.) *Proteome and protein analysis*. Springer, 1999:29-52.

3. Castellanos-Serra L, Vallin A, Proenza W, Le Caer JP, Rossier J. An optimized procedure for protein detection on CA-IEF and IPG gels. Application to the identification of IEF-separated isoforms by in-gel proteolysis and mass spectrometry analysis. *Electrophoresis* 2001;22 (In press).