Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana
Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"
Instituto Finlay

Identificación de mimotopos neutralizantes del virus de la hepatitis A, a partir de bibliotecas de péptidos presentados en fagos filamentosos

Tesis presentada en opción al Grado Científico
Doctor en Ciencias de la Salud

Autor: Lic. Alicia Aguilar Barroso, Ms C

La Habana
2014

Instituto Superior de Ciencias Médicas de la Habana
Instituto de Ciencias Básicas y Preclínicas "Victoria de Girón"
Instituto Finlay

Identificación de mimotopos neutralizantes del virus de la hepatitis A, a partir de bibliotecas de péptidos presentados en fagos filamentosos

Tesis presentada en opción al Grado Científico
Doctor en Ciencias de la Salud

Autor: Lic. Alicia Aguilar Barroso, Ms C

Tutores: Lic. Ela María Pérez Hernández, Dr C
Dr. Armando Acosta Domínguez, Dr C

Asesor: Lic. Arturo Talavera Coronel, Dr Cs

La Habana
2014

ABREVIATURAS Y ACRÓNIMOS

ABS: Albúmina bovina sérica
ACF: Adyuvante completo de Freund
AcM: Anticuerpos monoclonales
AGMK: células primarias de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops*
AgsHB: antígeno de supeficie del virus de la *Hepatitis B*
AIF: Adyuvante incompleto de Freund
ANOVA: Análisis de varianza de una vía
ARN: Ácido ribonucleico
BGMK: Línea celular de riñón de mono verde africano
BS-C-1: Línea celular de riñón de mono verde africano
BPFF: Biblioteca de péptidos presentados en fagos filamentosos
Cap: caperuza
Desviación estándar: DE
$DICT_{50}$: Dosis Infecciosas en Cultivo de Tejidos 50%
DMEM: Medio Dulbecco MEM
ECP: Efecto citopático
ELISA: Inmunoensayo ligado a enzimas (del inglés *Enzyme-linked immunosorbent assay*)
ESI-MS: espectrometría de masas de ionización por *electrospray* (del inglés *electrospray ionization mass spectrometry)*
HPLC: cromatografía líquida de alta resolución (del inglés *high performance liquid chromatography*)
HRP: Peroxidasa de rábano picante (del inglés *Horseradish peroxidase*)
IFN: Interferón
IFN-β: Interferón β
IFN-γ: Interferón γ
IL:Interleuquina
Ig:Inmunoglobulina:
i.p: intraperitoneal
IRF3: Factor regulatorio 3 de Interferón (del inglés *IFN regulatory factor 3*)
KLH: Hemocianina de Lapa (del inglés *Keyhole limpet hemocyanin*)
LAH: Líquido ascítico hiperinmune
LAN: Líquido ascítico negativo
LB: Luria Bertani
MAP: Sistema de péptidos de múltiples antígenos (del inglés *Multiple antigen peptide system).*
MAVS: proteína de señales antivirales de la mitocondria (del inglés *mitochondrial antiviral signaling protein*)
MRC-5: Línea celular diploide de pulmón humano
NBT/BCIP: Nitroazul de tetrazolio/ 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (del inglés *nitro-blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate*)
NP40: Nonidet P40
OMS: Organización Mundial de la Salud
OPD: Ortofenilendiamina (del inglés O*rthophenylenediamine*)
PI: período de incubación

RIFIT: ensayo de inhibición de radioinmunofocos (del inglés *radioimmunofocus inhibition assay*)
FRhK4: Línea celular de Riñón de mono *Rhesus* fetal
FRhK6: Línea celular de Riñón de mono *Rhesus* fetal
Frp/3: Línea celular de Riñón de mono *Rhesus* fetal
RIG-1: gen inducible del ácido retinoico-1 (del inglés *retinoic acid inducible gen 1)*
SBF: Suero bovino fetal
Slot Blot: ensayo de transferencia por ranuras (del inglés *Slot Blot*)
SPOS: Suero posinmunización
SPRE: Suero preinmune
SP2/O: célula de mieloma
SSTF: Solución salina tamponada fosfato
TLR3*:* Receptor tipo toll 3 (del inglés *Toll like receptor 3*)
TMB: Tetrametilbencidina
TRIF: proteína adaptadora que contiene el dominio TIR que induce Interferón β (del inglés *TIR domain-containing adaptor inducing IFN-*β)
UFC: Unidades formadoras de colonias
Vero: Línea celular de riñón de mono verde africano
VHA: virus de la *Hepatitis A*
VHC: virus de la *Hepatitis C*
VIH: virus de la *Inmunodeficiencia humana*

SINTESIS

La tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos es una alternativa para identificar mimotopos del virus de la *Hepatitis A* que pudieran constituir una fuente de antígeno para el desarrollo de una vacuna contra este virus, más económica que las existentes. En el presente trabajo, el empleo de una biblioteca de péptidos expuestos en fagos filamentosos permitió identificar, por primera vez, cuatro mimotopos que simulan epítopos del virus de la hepatitis A, basado en el reconocimiento por anticuerpos contra el virus presentes en sueros humanos. Tres de dichos mimotopos mostraron similitud aminoacídica con al menos una de las proteínas de la cápsida, VP1 y VP3. Los cuatro compitieron con el virus de la hepatitis A por la unión a anticuerpos contra este patógeno, presentes en sueros humanos. Se sintetizaron cuatro péptidos de acuerdo con la secuencia aminoacídica de estos mimotopos y se conjugaron a la Hemocianina de Lapa; así como un sistema de péptidos de múltiples antígenos de cuatro ramificaciones conteniendo dos de los mimotopos identificados. Los cuatro mimotopos identificados indujeron en ratones, anticuerpos neutralizantes al virus, al presentarse al sistema inmune expuestos en los fagos. Los cuatro péptidos conjugados indujeron respuesta de anticuerpos contra el virus que no tuvo carácter neutralizante y el sistema de péptidos de múltiples antígenos no indujo anticuerpos contra el virus. La inducción de respuesta neutralizante contra este agente infeccioso por los mimotopos expuestos en los clones de fagos, sugiere su posible utilidad como sustitutos del antígeno en un candidato vacunal donde se reproduzca la conformación e inmunogenicidad que presentan en el ambiente del fago.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN **1**

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA **8**

II.1 Virus de la *Hepatitis A* 8

II.1.1 Características del virión y virología molecular 8

II.1.2 Propagación en cultivos celulares 12

II.1.3 Aspectos clínico epidemiológicos de la hepatitis A 14

II.1.4 Patogénesis 18

II.1.5 Respuesta inmune a la infección viral 20

II.1.6 Prevención 24

II.1.7 Otras estrategias empleadas para desarrollar vacunas contra el VHA 25

II.2. Tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos 29

II.2.1 Características fundamentales de los fagos filamentosos 29

II.2.2 Exposición de bibliotecas de péptidos en fagos filamentosos 30

II.2.3 Aplicaciones de la tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos en el diseño de vacunas 32

II.2.4 Identificación de epítopos específicos relacionados con enfermedades 34

III. MATERIALES Y MÉTODOS **36**

III.1 Medios de cultivo 36

III.2 Líneas celulares 36

III.3 Microorganismos 36

III.4 Anticuerpos monoclonales 37

III.5 Aspectos éticos de la investigación 37

III.6 Sueros humanos 37

III.7 Biblioteca J404 de nonapéptidos expuestos en fagos 39

III.8 Selección por afinidad 39

III.9 Inmunoidentificación colonias 40

III.10 Selección de fagos empleando Slot Blot 41

III.11 Reactividad del panel de sueros con los clones de fago 41

III.12 Secuenciación del ácido nucleico de los fagos seleccionados y análisis de secuencias aminoacídicas 42

III.13 Ensayo de competencia de los fagos seleccionados 43

III.14 Síntesis de péptidos del VHA y conjugación a proteína portadora 44

III.15 Síntesis de MAP 45

III.16 Concentración de proteínas 46

III.17 Inmunización de ratones 46

III.17.1 Inmunización con los fagos 46

III.17.2 Inmunización con los mimotopos del VHA en diferentes formatos peptídicos 47

III.18 Ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos en ratones inmunizados 47

III.18.1 Determinación de anticuerpos anti-péptidos 47

III.18.2 Determinación de anticuerpos anti-VHA 48

III.19 Ensayo de neutralización 49

III.19.1 Titulación viral 49

III.19.2 Ensayo de neutralización del VHA 50

III.20 Análisis estadístico 51

IV. RESULTADOS **54**

IV.1 Identificación de mimotopos del VHA 54

IV.1.1 Selección de fagotopos específicos del VHA 54

IV.1.2 Secuenciación del ácido nucleico de los fagos seleccionados y alineamiento de secuencias aminoacídicas 56

IV.1.3 Ensayo de competencia de los fagos seleccionados 57

IV.2 Evaluación por ELISA de la respuesta de anticuerpos anti-VHA inducida en ratones por los fagos 58

IV.3 Evaluación de la respuesta de anticuerpos inducida por los péptidos conjugados y el MAP 59

IV.3.1 Inducción de anticuerpos anti-péptido en el tiempo y en dependencia de la dosis 60

IV.3.2 Comparación de la respuesta de anticuerpos anti-péptido entre los diferentes grupos 62

IV.3.3 Evaluación de la respuesta anti-VHA inducida por los dos formatos peptídicos 64

IV.4 Ensayo de neutralización 64

IV.4.1 Selección de controles positivos y negativos del ensayo 64

IV.4.2 Evaluación de la respuesta neutralizante al VHA inducida por los mimotopos 65

V. DISCUSIÓN **66**

V.1 Identificación de mimotopos del VHA 66

V.2 Evaluación de la capacidad de los mimotopos presentados en los clones de fago de inducir anticuerpos anti-VHA en ratones 72

V.3 Evaluación de la respuesta de anticuerpos anti-péptido inducida en ratones por los péptidos conjugados y el MAP 74

V.4 Evaluación de la respuesta de anticuerpos anti-péptido inducida en ratones por los péptidos conjugados y el MAP 76

V.5 Diferencias en la inmunogenicidad de los péptidos en los dos formatos peptídicos y en el contexto del fago 79

VI. CONCLUSIONES **84**

VII. RECOMENDACIONES **85**

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

IX. ANEXOS

X. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR

I. INTRODUCCIÓN

La hepatitis A es una enfermedad aguda cuyo agente etiológico es el virus de la *Hepatitis A* (VHA), perteneciente al género *Hepatovirus*, familia *Picornaviridae* (Hollinger y Emerson, 2007).

Este virus es desnudo, icosaédrico, con 27 a 32 nm de diámetro y su genoma está formado por una molécula de Ácido ribonucleico (ARN) de polaridad positiva (Hollinger y Emerson, 2007). Las proteínas VP1, VP2 y VP3 constituyen su cápsida; el ensamblaje de las mismas para formar la estructura del virión genera un sitio neutralizante inmunodominante en la estructura antigénica del VHA, que es de naturaleza conformacional e incluye los residuos aminoacídicos 70 y 74 de VP3 y 102, 171 y 176 de VP1 (Ping y Lemon, 1992). Existen evidencias de un segundo sitio de neutralización potencialmente independiente que contiene el residuo 221 de la proteína VP1 (Ping y Lemon, 1992), así como de otro sitio cercano al extremo amino terminal de VP1 (Lemon y col, 1992a). Este último hallazgo confirmó una observación previa de que un péptido derivado del extremo amino terminal de VP1 indujo anticuerpos neutralizantes contra el VHA (Emini y col, 1985). También, un epítopo continuo del VHA, comprendido en la secuencia de aa 110-121 de VP3, que indujo anticuerpos neutralizantes, fue descrito por Bosch y col, (1998).

Las cepas humanas del VHA se clasifican en un solo serotipo, de ahí que la infección con cualquier cepa humana confiera protección contra todas las cepas humanas relevantes (Lemon y col, 1992b). La inmunidad contra el VHA se debe, en primera instancia, a la

inducción de anticuerpos neutralizantes contra el virus. Bajos niveles de estos anticuerpos en el suero pueden generar una eficiente protección (Stapleton, 1995).

Se estima que anualmente se infectan en el mundo alrededor de 10 000 000 de personas y que se producen 1,5 000 000 de casos clínicos (Wasley y col, 2006; Franco y col, 2012.

La hepatitis A es más endémica en los países menos desarrollados donde las condiciones de pobreza facilitan la transmisión del virus, la cual se produce por la vía fecal-oral (Wasley y col, 2006; Hollinger y Emerson, 2007). Un cambio en el patrón epidemiológico de la hepatitis A, se ha producido en varias regiones del mundo, debido a la transición de muchos países hacia mejores condiciones socioeconómicas, lo que ha traído como consecuencia un mejoramiento de las condiciones higiénico sanitarias y por tanto una disminución en la transmisión del VHA para esos países. En estas circunstancias, la infección en los niños es menos frecuente y aumenta la proporción de adolescentes y adultos susceptibles (Wasley y col, 2006; Jacobsen y Wiersma, 2010; Conference Report, 2010; Franco y col, 2012). Considerando además, que la severidad de la enfermedad aumenta con la edad, se ha recomendado considerar la vacunación en la infancia en estas regiones. En los países con baja endemicidad, la vacunación se recomienda en grupos de riesgo (Wasley y col, 2006;

Los péptidos seleccionados con anticuerpos a partir de estas bibliotecas, han generado considerables expectativas sobre su utilización como sustitutos del antígeno natural. Su empleo como inmunógenos, en forma de péptidos sintéticos, ha inducido respuesta immune específica contra diferentes agentes infecciosos (Keller y col, 1993; Wang y col, 2005; Garay y col, 2011); lo cual los hace de interés para el desarrollo de candidatos vacunales peptídicos, que tienen como ventajas su alta pureza, seguridad, estructura definida del inmunógeno y bajos costos (Azzizi y Díaz-Mitoma, 2007; Fujita y Tagushi, 2011; Matsubara y col, 2012).

La estrategia para identificar péptidos que simulen epítopos de agentes infecciosos, a partir de bibliotecas de péptidos expuestos en fagos empleando sueros humanos, se estableció por Folgori y col, (1994). En dicha estrategia, el empleo de sueros humanos para la selección se basó, en que a pesar de la diversidad de la respuesta inmune humoral que se genera a un determinado agente etiológico en individuos diferentes, existe un repertorio similar de genes de anticuerpos que se expresa en estos individuos, de modo que se producen un conjunto de anticuerpos comunes en la población afectada por una misma enfermedad (Folgori y col, 1994). Esta metodología se empleó previamente para la identificación de mimotopos de diferentes virus (Folgori y col, 1994; Prezzi y col, 1996), pero no para el VHA.

La pesquisa de bibliotecas de péptidos expuestos en fagos filamentosos, empleando sueros humanos positivos a anticuerpos anti-VHA, para identificar mimotopos del virus, pudiera constituir una fuente alternativa de antígenos para desarrollar un candidato vacunal contra el VHA, que evite la manipulación del virus y disminuya los costos de producción.

I.1 HIPÓTESIS

A partir de una biblioteca de péptidos presentados en fagos filamentosos, empleando sueros humanos positivos a anticuerpos contra el VHA, es posible identificar mimotopos del virus de interés vacunal.

I.2 . OBJETIVOS

Objetivo general:

- Identificar mimotopos del VHA de interés vacunal con el empleo de una biblioteca de péptidos presentados en fagos filamentosos y sueros humanos positivos a anticuerpos anti-VHA.

Objetivos específicos:

1. Identificar mimotopos del VHA a partir de una biblioteca de péptidos presentados en fagos filamentosos.
2. Evaluar la capacidad de los mimotopos presentados en los fagos, de inducir anticuerpos anti-VHA en ratones.
3. Evaluar la capacidad de los mimotopos, conjugados a Hemocianina de Lapa (KLH, del inglés *Keyhole limpet hemocyanin*) y en el formato de Sistema de péptidos de múltiples antígenos (MAP, del inglés *Multiple antigen peptide*), de inducir anticuerpos anti-VHA en ratones.

I.3 Tareas

Para cumplimentar los objetivos anteriores nos trazamos las siguientes tareas.

1. Objetivo 1:

- Selección de fagotopos específicos al VHA

    Selección por afinidad

Inmunoidentificación de colonias

Selección de fagos empleando ensayo de transferencia por ranuras (Slot Blot)

Estudio de la reactividad del panel de sueros con los clones de fago

-Secuenciación del ácido nucleico de los fagos seleccionados y análisis de secuencias aminoacídicas

- Ensayo de competencia de los fagos seleccionados.

Objetivos 2 y 3:

- Inmunización de ratones con los mimotopos del VHA expuestos en los clones de fagos y como péptidos sintéticos (conjugados a KLH y en forma de MAP).
- Inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA, del inglés *Enzyme-linked immunosorbent assay*) para la detección de anticuerpos inducidos en los ratones inmunizados.
- Ensayo de neutralización del VHA.

I.4 Novedad científica y valor teórico

Por primera vez a nivel mundial:

-Se emplea la tecnología de presentación de péptidos en fagos filamentosos para la identificación de mimotopos del VHA.

-Se emplean sueros humanos positivos a anticuerpos contra el VHA para seleccionar mimotopos del virus, a partir de bibliotecas de péptidos presentados en fagos filamentosos.

-Se definen secuencias aminoacídicas con capacidad de inducir anticuerpos neutralizantes contra el VHA, al ser presentadas en fagos filamentosos empleados como inmunógenos.

I.5 Valor práctico

Los resultados de este trabajo son de utilidad en el diseño de candidatos vacunales contra el VHA.

Los mimotopos identificados pudieran ser evaluados para el desarrollo de un medio diagnóstico más económico.

El trabajo realizado sirvió de plataforma para el montaje de:

- La tecnología de presentación de péptidos en fagos filamentosos para su aplicación en la búsqueda de candidatos vacunales virales en el Instituto Finlay.

-Técnica de neutralización del VHA.

Los resultados presentados dieron lugar a publicaciones nacionales e internacionales.

Los resultados presentados en esta tesis se obtuvieron en el marco del Proyecto: IFVPI 0201 Vacuna contra la Hepatitis A (del Instituto Finlay), mediante la tecnología de expresión en fagos filamentosos. Estos resultados son el fruto de la colaboración entre el Instituto Finlay y la Universidad de Glasgow (Reino Unido).

II. REVISION BIBLIOGRÁFICA

II.1 Virus de la *Hepatitis A*

II.1.1 Características del virión y virología molecular

El VHA en un virus hepatotrópico el cual pertenece al género *Hepatovirus*, familia *Picornaviridae* (Hollinger y Emerson, 2007). Este virus se ha clasificado como desnudo, pero recientemente se demostró que las partículas virales se pueden liberar de las células infectadas, envueltas en membranas derivadas de las mismas (Feng y col, 2013).

El virión mide de 27 a 32 nm de diámetro. Está formado por la cápsida de simetría icosaédrica, compuesta por 60 copias de las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 (también conocidas como 1D, 1B, 1C); dentro de la misma se encuentra una molécula de ARN de simple cadena y polaridad positiva, de aproximadamente 7500 nucleótidos (Hollinger y Emerson, 2007).

La estructura del genoma se representa en la Figura 1. El mismo está dividido en tres regiones: una no codificante que se encuentra en el extremo 5', el cual tiene unida la proteína VPg y no presenta caperuza (cap); un marco de lectura abierto, que codifica para una poliproteína que se divide en tres dominios funcionales (P1, P2, y P3) que darán origen a las proteínas estructurales (P1) y no estructurales (P2 y P3) del virión y una pequeña región no codificante hacia el extremo 3', en el cual existe una cola de poli A (Hollinger y Emerson, 2007). Las proteínas no estructurales 2B, 2C, 3A y 3B (también conocida como VPg) son necesarias para la replicación del ARN. La proteína 3C es la responsable de la mayoría de los cortes postranscripcionales que ocurren en la polipropteína y la proteína 3D es la ARN polimerasa dependiente de ARN (Martin y Lemon, 2006). Evidencias

experimentales sugieren que la proteína 2A juega un importante papel en la morfogénesis viral (Cohen y col, 2002).

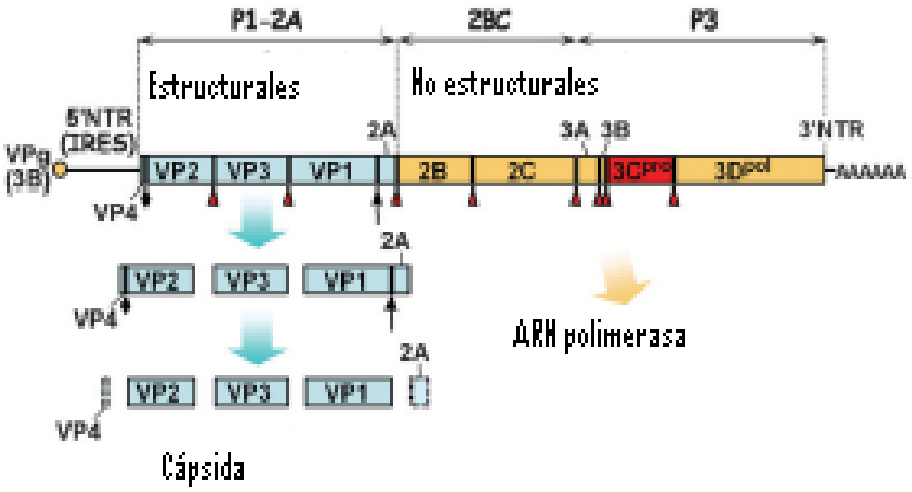


Figura 1. Genoma de VHA. Tomado de Martin A, Lemon SM. Hepatology. 2006; 43:164-172.

Las proteínas virales se traducen directamente a partir del ARN genómico, el cual funciona como ARN mensajero. En la región no codificante del extremo 5´ se identificó un sitio interno de entrada al ribosoma, el cual dirige la traducción cap-independiente de la poliproteína (Redondo y col, 2012). El procesamiento proteolítico de la poliproteína ocurre simultáneamente con la traducción (Martin y Lemon, 2006).

Para la síntesis de ARN es necesario el ensamblaje del complejo de replicación que contiene las proteínas 2B-3D. Se cree que la proteína VPg funcione como un cebador para la síntesis de la cadena de ARN de polaridad negativa y la posterior síntesis del ARN progenie de polaridad positiva (Martin y Lemon, 2006).

Además de la proteína 2A, se ha planteado que la VP4 (también conocida como 1A) pudiera intervenir en la morfogénesis del virión. Para el ensamblaje de la cápsida del VHA, es necesario un corte en la unión de las proteínas 2A-2B, mediado por la proteasa 3C, para dar lugar al precursor P1-2A, el cual es posteriormente cortado por dicha proteína para generar VP0 (VP4-VP2), VP1-2A y VP3 (Martin y Lemon, 2006). A partir de los anteriores precursores se forman los protómeros 5s. El ensamblaje de cinco protómeros da lugar a los pentámeros 14s (los cuales contienen 5 copias de cada uno de los anteriores precursores de la cápsida). Doce pentámeros se ensamblan para formar las cápsidas vacías 70s (procápsidas) o incorporar ARN (proviriones) (Anderson y Ross, 1990). El procesamiento VP1-2A para dar lugar a VP1 comienza después del ensamblaje de las procápsidas o proviriones y es llevado a cabo por una proteasa celular no identificada (Martin y col, 1999). La mayoría de los picornavirus contienen la VP4 en su cápsida, sin embargo, esta proteína no se ha identificado en los viriones del VHA (Martin y Lemon, 2006). La maduración del virión se alcanza cuando se produce el corte de VP0 para dar lugar a VP2 y VP4 (Hollinger y Emerson, 2007).

El ensamblaje de las proteínas de la cápsida para formar la estructura del virión, genera un sitio neutralizante inmunodominate en la estructura antigénica del VHA que es de naturaleza conformacional (Hughes y col, 1984; Hughes y Staton, 1985; Stapleton y Lemon, 1987; Ping y col, 1988; Ping y Lemon, 1992) e involucra los residuos aminoacídicos (70 y 74) de la proteína VP3 y (102, 171 y 176) de VP1 (Ping y col, 1988; Ping y Lemon, 1992). Existen evidencias de un segundo sitio de neutralización, potencialmente independiente, que contiene el residuo 221 de la proteína VP1 (Ping y Lemon, 1992), así como de otro sitio cercano al extremo amino terminal de VP1 (Lemon y

col, 1992a). Este último hallazgo confirmó una observación previa de que un péptido derivado del extremo amino terminal de VP1 indujo anticuerpos neutralizantes al VHA (Emini y col, 1985). También, un epítopo continuo del VHA, comprendido en la secuencia de aa 110-121 de VP3, que indujo anticuerpos neutralizantes, fue descrito por Bosch y col, (1998).

La información sobre la estructura antigénica del VHA se ha derivado, en gran medida, de ensayos de competencia con anticuerpos monoclonales (AcM) murinos y estudios con mutantes de escape a la neutralización (Hughes y col, 1984; Stapleton y Lemon, 1987; Ping y col, 1988; Ping y Lemon, 1992). Se ha observado que los AcM neutralizantes al VHA compiten entre sí y son capaces de bloquear la unión de anticuerpos policlonales específicos, sugiriendo la existencia de un número limitado de epítopos neutralizantes agrupados muy cercanamente sobre la superficie del virión (Stapleton y Lemon, 1987).

Mediante estudios con AcM se demostró que tres epítopos pertenecientes a este sitio inmunodominante se localizaron en las subunidades pentaméricas 14s, mientras que otros dos epítopos se formaron después del ensamblaje de las subunidades 14s dentro de la cápsida (Stapleton y col, 1993).

Se han generado AcM de chimpancé (Schofield y col, 2002) y humanos (Cao y col, 2008) neutralizantes al VHA mediante la tecnología de exposición de bibliotecas de anticuerpos en fagos, los cuales reconocieron epítopos agrupados dentro del sitio de neutralización inmunodominante.

Todas las cepas del VHA pertenecen a un único serotipo, el cual es antigénicamente distinto del resto de los picornavirus (Hollinger y Emerson, 2007). Las cepas del VHA que

afectan al humano se agrupan en los genotipos: I, II, III y VII (los genotipos IV, V y VI se encontraron en simios) teniendo en cuenta la divergencia de un 15-20% en la posición de los nucleótidos de la secuencia VP1-2A. Los genotipos I y III a su vez se dividieron en sub-genotipos A y B (Robertson y col, 1992).

La mayoría de las cepas humanas de referencia se caracterizaron como genotipo I: CR-326, MS-1, SD11, HAS-15 (sub-genotipo 1A) y HM175 y MBB (sub-genotipo 1B) (Lemon y Robertson, 1993).

La primera cepa aislada en Cuba, M2 clon C5 se clasificó como subgenotipo IA junto con el resto de las cepas americanas. Se clasificó como una cepa independiente. En otro estudio, 27 cepas del VHA procedentes de aislamientos clínicos cubanos se agruparon en el subgenotipo IA (Díaz y col, 1999; Díaz y col, 2001).

A pesar de la heterogeneidad genómica entre las cepas del VHA, existe una elevada homogeneidad en cuanto a sus características antigénicas y biológicas (Lemon y col, 1983; Lemon y col, 1992b). No parece existir variación significativa en la conformación de los epítopos que determinan la neutralización del virus, ya que los anticuerpos policlonales brindan neutralización cruzada contra virus de todos los genotipos. Por lo tanto, una vacuna preparada a partir de una cepa del VHA, que induzca anticuerpos neutralizantes, va a proteger contra el resto de las cepas del género *Hepatovirus* (André, 1995).

II.1.2 Propagación en cultivos celulares

Varios cultivos primarios y líneas celulares de origen de primate permiten la multiplicación del VHA. Se han utilizado células primarias de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops* (AGMK) y líneas celulares diploides de pulmón humano (MRC-5),

esta última debido a su disponibilidad para la producción de vacunas. Las líneas celulares derivadas de AGMK (BS-C-1, Vero y BGMK), riñón de mono *Rhesus* fetal (FRhK4, FRhK6, Frp/3) y hepatoma humano (Alexander) han sido ampliamente utilizadas para estudiar la replicación y propagar grandes cantidades de virus. Sin embargo, este virus es difícil de aislar y multiplicar en cultivos celulares requiriendo varias semanas y pases ciegos. Las cepas adaptadas a multiplicarse *in vitro* presentan un ciclo de replicación lento; generalmente necesitan varios días a semanas para que se produzcan las máximas concentraciones de virus y usualmente producen poco o ningún efecto citopático (ECP) (Hollinger y Emerson, 2007).

Por ello, para la detección de la multiplicación del VHA se han empleado: ensayos inmunológicos para la detección de antígeno viral como inmunofluorescencia (Konduru y col, 2009), ELISA (Costa y col, 2013; Park y col, 2013), ensayo de radioinmunofocos (Lemon y col, 1983), inmunoperoxidasa (Nadala y Loh, 1990) e inmunoblot (Nimmagadda y col, 2012); o ensayos para detectar secuencias de ácidos nucleicos virus-específicas como la Reacción en Cadena de la Polimerasa (de Paula y col, 2009; Costa y col, 2013; Qiu F y col, 2013; Irshad y col, 2013).

El aislamiento de cepas citopáticas del VHA (Lemon y col, 1991) permitió desarrollar ensayos basados en la aparición de ECP para la titulación viral y evaluación de la presencia de anticuerpos neutralizantes contra el VHA (Beales y col, 1996; Silberstein y col, 2003) los cuales son simples, emplean técnicas tradicionales de cultivo de tejidos, no necesitan un sistema de detección complejo y pueden ser útiles para el control de vacunas y validación de protocolos de inactivación (Beales y col, 1996).

II.1.3 Aspectos clínico epidemiológicos de la hepatitis A.

Se estima que anualmente se infectan con el VHA alrededor de 10 millones de personas a nivel mundial y que se producen aproximadamente 1,5 millones de casos clínicos de hepatitis A (Wasley y col, 2006; Franco y col, 2012). Los brotes de hepatitis A son comunes en instituciones cerradas; también pueden ocurrir en población abierta casi siempre relacionados con la contaminación de la fuente de abasto de agua. El consumo de ostras crudas o almejas cocidas de manera inapropiada, procedentes de aguas contaminadas con aguas negras, también ha producido brotes de hepatitis A. La vía principal de transmisión es la fecal-oral, a través de un estrecho contacto personal o a través de la ingestión de agua y alimentos contaminados (Franco y col, 2012). La transmisión parenteral es rara, aunque se han reportado casos de hepatitis A postransfusionales sobre todo en hemofílicos. También se ha encontrado transmisión entre homosexuales masculinos (Hollinger y Emerson, 2007; Linkins y col, 2013) y en usuarios de drogas intravenosas (Lugoboni y col, 2012). No se han reportado infecciones persistentes, ni hepatitis A crónica. La hepatitis A severa con curso fatal es rara (Hollinger y Emerson, 2007).

Desde el punto de vista clínico la hepatitis A es similar al resto de las hepatitis, pero su aparición es más súbita. El curso de la enfermedad se puede dividir en cuatro fases clínicas: período de incubación o período preclínico, fase prodrómica o preictérica, fase ictérica y fase convaleciente (Hollinger y Emerson, 2007). El período de incubación (PI) es de 10-50 días (media de 28 a 30 días); durante este tiempo el individuo es asintomático, pero libera el virus en las heces fecales. El período de infectividad máxima ocurre durante la segunda mitad del PI y continúa varios días después del inicio de la ictericia o en el período de máxima actividad enzimática en los enfermos anictéricos. Después de la primera semana de

la enfermedad, la mayor parte de los casos no son infecciosos. La fase prodromal varía de unos días a más de una semana y precede la ictericia, se caracteriza por anorexia, fiebre, fatiga, cefalea, mialgia, náuseas, vómitos y dolor abdominal. En la fase ictérica aparece la orina oscura causada por los niveles elevados de bilirrubina y la característica coloración amarillenta de la piel y los ojos; los signos clínicos tales como hepatomegalia se presentan en la mitad de los pacientes. La enfermedad dura alrededor de dos a tres semanas seguida de un largo período de convalecencia. La recaída sintomática es poco frecuente y ocurre entre el 3 y el 20% de los casos (Hollinger y Emerson, 2007). Debido a esta enfermedad las personas pueden ausentarse del trabajo y la escuela durante un largo período de tiempo por lo cual la enfermedad conlleva a pérdidas económicas (Jacobsen y Wiersma, 2010).

El curso de la infección con el VHA varía con la edad. Los niños menores de seis años son frecuentemente asintomáticos, mientras que los niños mayores y los adultos frecuentemente presentan síntomas de la enfermedad. La severidad del cuadro clínico aumenta con la edad y las enfermedades crónicas del hígado (Saberifiroozi y col, 2011; Franco y col, 2012).

La asociación de riesgo de infección por el VHA con las normas de higiene y saneamiento, la expresión clínica de la enfermedad en dependencia de la edad y la inmunidad de por vida, determinan los diferentes patrones de infección por el VHA observados en el mundo. El nivel de endemicidad del VHA (alta, intermedia y baja) para una población, se define por los resultados de los estudios de seroprevalencia con relación a la edad (Franco y col, 2012).

En las regiones con alta endemicidad las condiciones sanitarias e higiénicas son muy deficientes. La mayoría de las personas se infectan en la primera infancia, las tasas de la enfermedad son relativamente bajas y los brotes no son comunes. En estas áreas se incluyen

los países de bajos ingresos de África, Asia y América Central y del Sur (Wasley y col, 2006; Jacobsen y Wiersman, 2010).

En las zonas de endemicidad intermedia (los países en desarrollo de Europa del Este, África, Asia y América) las condiciones sanitarias y de higiene varían y algunos niños no se enferman durante la primera infancia. Las tasas máximas de infección ocurren comúnmente en la infancia más tardía o la adolescencia. Paradójicamente, como la transmisión del VHA se produce en estas áreas en los grupos de mayor edad, las tasas de la enfermedad pueden ser más altas que en los países menos desarrollados, donde la transmisión del virus es de más alta endemicidad (Wasley y col, 2006; Jacobsen y Wiersman, 2010; Franco y col, 2012).

En los países más desarrollados la endemicidad es baja, las condiciones higiénicas son buenas y la infección en los niños es generalmente baja. Las tasas máximas de infección y enfermedad tienden a estar entre los adolescentes y los adultos jóvenes. La enfermedad predomina en los grupos específicos de riesgo para adultos: los viajeros a países donde la hepatitis A es endémica, los usuarios de drogas intravenosas y los hombres con un historial de comportamiento homosexual (Wasley y col, 2006; Franco y col, 2012).

En muchas partes del mundo, la tasa de seroprevalencia de anti-VHA está disminuyendo debido al mejoramiento de las condiciones socioeconómicas, acceso al agua potable y disponibilidad de vacunas. Esto ha conducido a que en estas regiones haya aumentado considerablemente la edad media a la infección, a que haya una población de adolescentes y adultos susceptibles con riesgo de padecer la enfermedad y a que se produzcan brotes de la misma (Jacobsen y Wiersman, 2010; Franco y col, 2012; Conference Report, 2010).

La política de vacunación recomendada por la OMS se basa en la evaluación del costo-beneficio y la sostenibilidad de las estrategias de prevención en el contexto epidemiológico de cada país (Hendrickx y col, 2008; OMS, 2012). La posición de la OMS (2012) respecto a la vacunación frente a la hepatitis A es la siguiente:

- Introducción sistemática en los calendarios infantiles una vez conocida la incidencia de hepatitis A aguda, si existe un patrón de cambio de endemicidad y el análisis de costo/efectividad.
- No recomienda la vacunación en países de alta endemicidad por infectarse mayoritariamente en la infancia.
- Sí la recomienda en países en transición a endemicidad intermedia desde una alta.
- En países de baja endemicidad recomienda la vacunación en grupos de riesgo (viajeros, personas en tratamiento prolongado con hemoderivados, homosexuales, trabajadores en contacto con primates no humanos, en adictos a drogas parenterales y en pacientes en riesgo de hepatitis fulminante).
- Es preferible el uso de vacuna a inmunoglobulina (Ig) en pre y en posexposición.

En Cuba, la hepatitis A representa del 80-90% de todas las hepatitis virales (Rodríguez y col, 2006). En el período desde 1992-2002 se demostró una alta endemicidad. Fue más frecuente en niños y adolescentes, el 45% de los casos se notificó en los menores de 15 años y el 71,7% en los menores de 24. La evolución estacional varió por provincias, observándose un alza de agosto a noviembre en la mayoría de ellas. La hepatitis A tiene un ciclo epidémico cada cinco años siendo la causa principal la acumulación de individuos susceptibles (Aguiar, 2004). Se producen por encima de 20 000 casos anuales en los picos epidémicos (Boletín epidemiológico semanal IPK, 2008). En un estudio realizado en 2005,

en el municipio La Lisa, se observó un desplazamiento de la prevalencia de anticuerpos anti-VHA a mayores edades (Quintana y col, 2005). A partir de 2006, el número de casos comenzó a disminuir (Anuario estadístico MINSAP, 2011). Puede ocurrir cocirculación y coinfección del VHA y del virus de la hepatitis E (Rodríguez y col, 2006; Rodríguez y col, 2008).

II.1.4 Patogénesis

Gran parte del conocimiento que se tiene sobre la patogénesis de la hepatitis A se ha obtenido a partir de estudios en primates no humanos. Los chimpancés, titíes, micos, monos lechuza y monos Saimari, son susceptibles al VHA. En ellos la enfermedad es generalmente más leve comparada con las infecciones sintomáticas en humanos, pero el curso de la infección es muy similar (Martin y Lemon, 2006).

La secuencia de eventos que comienzan con la entrada del VHA por el tracto gastrointestinal y resultan en la enfermedad no se han dilucidado completamente. Se plantea que el virus alcanza el tracto gastrointestinal y llega hasta el hígado donde se replica en los hepatocitos (sitio primario de replicación). La replicación del virus en sitios extrahepáticos antes de alcanzar el hígado no está bien dilucidada (Martin y Lemon, 2006; Hollinger y Emerson, 2007). Amado y col, (2010) demostraron que el VHA puede replicarse tempranamente en las glándulas salivales. El virus se libera al torrente sanguíneo y simultáneamente se presenta en la bilis, eliminándose en las heces fecales. La viremia se detecta generalmente entre la tercera y la cuarta semana de infección coincidiendo con el período de incubación y culmina muy poco antes de que aparezcan los síntomas (Hollinger y Emerson, 2007). La máxima eliminación de virus en las heces fecales es seguida por una

marcada elevación de las enzimas aminotransferasas como expresión del daño hepático. El virus continúa eliminándose en las heces hasta dos a tres semanas después de la primera elevación de las enzimas aminotransferasas (Martin y Lemon, 2006). El VHA puede circular en la sangre envuelto en membranas que adquiere de la célula hospedera, que lo pueden proteger temporalmente de los anticuerpos neutralizantes y se libera desnudo en las heces fecales (Feng y col, 2013).

En estudios realizados en chimpancés, el ARN viral se detectó en las heces fecales hasta las 20 semanas posinfección y durante 6 a 8 semanas en el suero; pudiendo persistir en el hígado hasta la semana 48 posinfección. Los picos máximos en heces, hígado y suero, se alcanzaron entre las semanas dos y tres (Landford y col, 2011).

Una glicoproteína integral de membrana de clase I, tipo mucina, se identificó como receptor para el VHA, en células de riñón de mono verde africano (Kaplan y col, 1996). Un análogo humano de esta proteína se identificó como receptor para el virus (Feigelstock y col, 1998). Estudios *in vitro* (Dotzauer y col, 2000) e *in vivo (*Dotzauer y col, 2012) sugieren que la asialoglicoproteína receptora presente en las células hepáticas (que participa en la entrada de IgA a los hepatocitos), pudiera jugar un papel en la entrada del VHA, a dichas células, mediada por la formación de un inmunocomplejo con la IgA. De esta forma la IgA que se sintetiza y libera en el tracto intestinal pudiera mediar el transporte de cierta fracción del virus de regreso al hígado, así como la reinfección de los hepatocitos. Esto pudiera ayudar a explicar los casos donde ocurren recaídas sintomáticas de la enfermedad (Dotzauer y col, 2000; Dotzauer y col, 2012).

Los mecanismos responsables del daño hepatocelular están poco caracterizados, sin embargo, la hepatitis A parece ser atribuible más a una respuesta inmunológica que a un ECP directo del virus a los hepatocitos. La elevación de las enzimas aminotransferasas como manisfestación del daño hepatocelular coincide con la aparición de anticuerpos neutralizantes en el suero (Martin y Lemon, 2006). Estudios *in vitro* aportaron evidencias de la lisis de células infectadas con el VHA mediada por las células asesinas naturales y linfocitos T citotóxicos CD8+. A partir del hígado de pacientes con hepatitis A aguda, se aislaron y propagaron en cultivo, linfocitos T citotóxicos CD8+, que produjeron Interferón γ (IFN-γ) y lisaron fibroblastos infectados con el VHA (Martin y Lemon, 2006; Zhou y col, 2012). Landford y col, (2011) observaron en muestras de hígado de chimpancés, durante las semanas tres y cuatro de la infección, un infiltrado periportal masivo de células mononuleares que se extendió al parénquima. El infiltrado inflamatorio se asoció con balonamiento y necrosis severa de los hepatocitos y se correlacionó con la aparición de anticuerpos específicos al virus.

II.1.5 Respuesta inmune a la infección viral

Después de la infección, el VHA se replica por varias semanas en el hígado durante el PI. Al final de este período se detectan altos títulos virales en el hígado, las heces, y en menor medida, en la sangre. A pesar de ello, durante este tiempo hay pocas evidencias de daño hepático. No es hasta la cuarta o quinta semana de infección que aparecen las manifestaciones clínicas, junto con la primera evidencia de una respuesta inmune al virus (Martin y Lemon, 2006).

Varios estudios sugieren que este prolongado período asintomático, a pesar de una activa replicación viral en el hígado, pudiera reflejar la capacidad del VHA de evadir la respuesta inmune innata (Martin y Lemon, 2006; Qu y Lemon, 2010; Landford y col, 2011). La infección por VHA induce una muy limitada respuesta de Interferón (INF) tipo I en el hígado (Landford y col, 2011). Se demostró que la infección con el VHA bloquea la activación del gen inducible del ácido retinoico-1 (RIG-1, del inglés *RIG-1 retinoic acid inducible gen I*) mediada por el Factor regulatorio 3 de IFN (IRF3, del inglés *IFN regulatory factor 3*) y la expresión de Interferón β (IFN-β) *in vitro* (Brack y col, 2002; Fensterl y col, 2005). En el trabajo realizado por Fensterl y col, (2005) se demostró que la transmisión de señales mediada por RIG-1 se interrumpe cuesta arriba de las enzimas quinasas (IKKε y TBK1) responsables de la fosforilación de IRF3. Un estudio realizado por Yang y col, (2007) reveló que esta interrupción de la activación de RIG-1 pudiera deberse a la proteólisis de la proteína de señales antivirales de la mitocondria (MAVS, del inglés *mitochondrial antiviral signaling protein*) por el segmento 3ABC de la poliproteína del VHA. El corte de MAVS requiere la actividad proteasa de 3C y el dominio transmembrana de 3A. 3ABC se dirige a la mitocondria donde colocaliza y corta MAVS. El corte de MAVS por 3ABC resulta en su liberación de la mitocondria e imposibilidad de transmitir la señal cuesta arriba de las enzimas quinasas, se interrumpe la activación de IRF3 y no se induce la expresión del gen de INF-β.

También el VHA bloquea parcialmente la expresión de IFN-β mediada por la molécula que contiene el dominio TIR que induce IFN-β (TRIF, del inglés *TIR domain-containing adaptor inducing IFN-β*), la cual es la molécula adaptadora del Receptor tipo toll 3 (TLR3, del inglés *Toll like receptor 3*). Este estudio se realizó en células fetales de riñón de monos

rhesus (Fensterl y col, 2005). En un estudio conducido por Qu y col, (2011) se demostró que el segmento 3CD de la poliproteína del VHA degrada la molécula TRIF, interrumpiéndose la transmisión de la señal y por tanto la expresión de IFN-β.

La respuesta inmune adaptiva a la infección por el VHA es robusta y efectiva en eliminar el virus. Desde el comienzo de los síntomas se pueden detectar anticuerpos de clase IgM y también puede estar presente la IgG (Martin y Lemon, 2006). La respuesta de IgM, desaparece usualmente dentro de los 3-6 meses después del desarrollo de los síntomas, aunque en algunos casos se ha detectado hasta un año después de la infección. La IgG anti-VHA es la principal clase de anticuerpo encontrada durante la convalecencia y se plantea que frecuentemente persiste de por vida; las evidencias indican que es la línea de defensa primaria contra la reinfección (Stapleton, 1995).

La inmunización pasiva pre y posexposición con Ig humanas del suero es efectiva (90%) en la prevención de la hepatitis A; bajos niveles de estos anticuerpos en el suero pueden generar una eficiente protección. La inmunidad contra el VHA se debe, en primera instancia, a la inducción de anticuerpos neutralizantes (Stapleton, 1995). Los mismos pueden detectarse a partir de la cuarta semana de infección viral (Zhou y col, 2012). Tanto los anticuerpos de clase IgM como IgG neutralizan el VHA (Lemon y Binn, 1983). Se sugiere que la inmunidad intestinal no juega un papel significativo en la protección contra esta enfermedad. Se ha detectado una baja prevalencia de anticuerpos neutralizantes de clase IgA, en heces fecales de monos y humanos así como en saliva de pacientes con hepatitis A (Stapleton y col, 1991).

En un estudio reciente se demostró que el virus envuelto en membranas celulares no fue neutralizado por un AcM anti-VHA cuando se preincubó con el mismo e inoculó posteriormente en cultivos celulares; sin embargo, la neutralización si tuvo lugar cuando las células se expusieron a los anticuerpos, inmediatamente antes de inocular el virus o hasta seis horas después de la inoculación, de lo cual se ha sugerido que el virus cuando se encuentra envuelto en las membranas celulares sea neutralizado después de unirse a los hepatocitos o durante la entrada a los mismos (Feng y col, 2013).

Las células T citotóxicas específicas al virus se han identificado en el hígado durante la infección aguda por el VHA y se plantea que pudieran contribuir al aclaramiento de la infección (Martin y Lemon, 2006). Varios epítopos de células T CD8+ se describieron en pacientes con infección aguda y convaleciente (Schlute y col, 2011). En un estudio conducido por Zhou y col, (2012), estas células se detectaron en sangre, ejercieron su función efectora después de la cuarta semana posinfección y disminuyeron bruscamente alrededor de la octava semana, a pesar de la presencia (en altos títulos) de los genomas virales en el hígado. Las mismas produjeron IFN-γ y también fueron positivas para el marcador de degranulación CD107a, relacionado con la actividad citotóxica.

Los resultados del estudio anterior también documentaron un papel dominante y no reconocido previamente, de las células T CD4+ en la eliminación viral. Estas células produjeron citoquinas como IFN-γ, Interleuquina (IL)-2, TNF e IL-21 en la cuarta semana posinfección, momento en que la replicación viral declina bruscamente, así como durante un segundo período de liberación del virus en las heces fecales (cuatro-seis semanas más tarde). La respuesta de las células T CD4+ disminuyó lentamente durante varios meses hasta la eliminación de los genomas del VHA del hígado (Zhou y col, 2012).

II.1.6 Prevención

La principal medida para prevenir la infección es el mejoramiento de las condiciones higiénico-sanitarias de la población (Hollinger y Emerson, 2007).

La Ig es efectiva en un 80-90% para prevenir hepatitis clínica, cuando se administra antes de la exposición al virus o tempranamente en el período de incubación, pero sólo ofrece protección de tres a seis meses, sin prevenir la infección en casos de exposición mantenida al agente (Stapleton, 1995).

Varias vacunas comerciales, seguras y efectivas están disponibles para prevenir la hepatitis A (Wasley y col, 2006; Conference report, 2010; Franco y col, 2012; Ott y col, 2012).

La vacuna inactivada Havrix de la firma Smith-Kline Becham Biologicals, emplea la cepa HM-175 adaptada a crecer en células MRC-5, inactivada con formalina (Hollinger y Emerson, 2007). También existe otra vacuna inactivada (VAQTA, Laboratorios de Investigación Merck) en cuya preparación se utiliza la cepa atenuada CR326F8 inactivada con formalina multiplicada en células MRC-5 (Hollinger y Emerson, 2007). Tanto la Havrix como VAQTA han sido extensamente evaluadas en ensayos clínicos, presentando una buena inmunogenicidad, eficacia y seguridad (Wasley y col, 2006; Van Herck y col, 2011; Van Herck y col, 2012).

Otra vacuna inactivada, la AVAXIM (Aventis Pasteur) presenta una inmunogenicidad similar a las anteriores (Wasley y col, 2006; Li y col, 2013a).

La vacuna EPAXAL (Berna Biotech Ltd.) contiene partículas del VHA (cepa RG-SB) inactivadas con formalina e incorporadas en virosomas de influenza, los cuales están formados por liposomas que contienen hemaglutinina, neuraminidasa y fosfolípidos del

virus influenza. Esta vacuna es bien tolerada, altamente inmunogénica y presenta buena eficacia (Wasley y col, 2006; Bovier y col, 2010; Chan y Yeh, 2012).

Además existen vacunas combinadas como la vacuna contra la hepatitis A y B (TWINRIX, SKB). Esta vacuna es inmunogénica, bien tolerada e induce niveles de anticuerpos contra las dos infecciones (Marshall y col, 2010; Chlibek y col, 2011a; Chlibek y col, 2011b, van Damme P y col, 2011).

Una vacuna inactivada (Healive) se ha obtenido y aplicado en China, la cual es segura y muestra una inmunogenicidad similar a la Havrix (Li y col, 2013b; Liu y col, 2013).

Dos vacunas vivas atenuadas se han obtenido y aplicado en China: una utilizando la cepa H2 del VHA (HAVAC) y la otra, empleando la cepa LA-1; dichas cepas virales se adaptaron a crecer en células diploides humanas a 32ºC (Hollinger y Emerson, 2007). Estas vacunas son seguras inmunogénicas y eficaces (Hollinger y Emerson, 2007; Li y col, 2013b; Liu y col, 2013).

Estas vacunas licenciadas representan un paso importante en el control de las infecciones por el VHA en los países desarrollados; sin embargo, la producción baja del virus en cultivos celulares conduce a que los costos de producción de las mismas sean altos, lo que dificulta su uso en campañas de vacunación en los países en desarrollo (Muñoz y col, 2004).

II.1.7 Otras estrategias empleadas para desarrollar vacunas contra el VHA

Otras alternativas para el desarrollo de vacunas contra este virus incluyen: la obtención de cápsidas vacías, las vacunas de proteínas recombinantes, y los vectores bacterianos y virales vivos. Cápsidas vacías del VHA obtenidas en células de *Spodoptera frugiperda*, a

partir de un baculovirus recombinante, indujeron anticuerpos neutralizantes en ratones a la dilución 1:4 del suero (Rosen y col, 1993). También el marco de lectura abierto del genoma del VHA se clonó en virus vaccinia y se formaron partículas subvirales 14s y 70s que indujeron anticuerpos neutralizantes en ratones (Stapleton y col, 1993). Se obtuvieron cápsidas vacías del VHA en células de plantas de tabaco transgénico; se sugirió la posibilidad de emplear células de plantas transgénicas para expresar partículas virales complejas para la producción de vacunas (López y col, 2008).

En cuanto a los candidatos basados en proteínas recombinantes, Johnston y col, (1998) expresaron la proteína VP1 en *E.coli*. La inmunización de conejos con dicha proteína indujo anticuerpos anti-VP1, pero no anti-VHA. Gauss-Müller y col, (1990) obtuvieron varias proteínas recombinantes (VP1 y VP3) y sólo dos indujeron una respuesta transitoria de anticuerpos neutralizantes en conejos. También la proteína VP1 se expresó en células de *Drosophila melanogaster* S2 (Schneider 2) e indujo anticuerpos anti-VHA en ratones (Lee y col, 2009). La proteína VP1-2A purificada de *E.coli*, así como un vector bacteriano vivo, *Lactococcus lactis*, que expresaba dicho segmento indujeron altos títulos de anticuerpos anti-VHA, no neutralizantes en ratones (Berlec y col, 2013).

Como ejemplos de la variante de vectores virales vivos encontramos que dos poliovirus quiméricos (expresando las secuencias aminoacídicas 13-24 y 101-108 de VP1) indujeron anticuerpos neutralizantes en ratones y conejos (Lemon y col, 1992a). También se construyó un virus vaccinia recombinante expresando antígenos del VHA que indujo anticuerpos neutralizantes en curiel (Liu y col, 1996).

Otra alternativa a las vacunas convencionales ha sido el desarrollo de candidatos vacunales basados en péptidos sintéticos que sean capaces de inducir una respuesta inmune eficiente. Este tipo de vacuna ofrece la ventaja de ser segura, pues no se emplea material infeccioso, presentar alta pureza y en ella el inmunógeno tiene una estructura definida. Su principal desventaja radica en su poca inmunogenicidad (Azizi y Díaz-Mitoma, 2007; Fujita y Taguchi, 2011).

La síntesis de MAPs, así como garantizar la estimulación de las células T auxiliadoras han sido estrategias ampliamente utilizadas para mejorar la inmunogenicidad de los péptidos sintéticos y generar respuestas de anticuerpos específicos y protectores (Tam, 1995; Garay y col, 2011; Vincet, 2011; Fujita y Taguchi, 2011; Schiavone y col, 2012).

Para lograr la estimulación de las células T auxiliadoras se han empleado metodologías como la conjugación de péptidos y MAPs a proteínas portadoras (Haro y col, 1995; Garay y col, 2011; Vincent y col, 2011) y también, la incorporación de epítopos de células T auxiliadoras a MAPs (Pintó y col, 1998; Fujita y Taguchi, 2011; Garay y col, 2011).

Entre los epítopos de células T auxiliadoras que se han incluído en los MAPs se encuentran: epítopos propios del mismo agente infeccioso en estudio, de agentes diferentes (Pintó y col, 1998) o epítopos promiscuos como los presentes en el toxoide tetánico (Garay y col, 2011).

Por otra parte, para aumentar la inmunogenicidad de los péptidos, también se han realizado construcciones peptídicas conteniendo epítopos de células T citotóxicas, además de epítopos B y T auxiliadores colinearmente sintetizados y se han utilizado otras variantes como la incorporación de lípidos a los péptidos, incrementar la longitud del péptido, la

vinculación de péptidos a liposomas (Haro y col, 2003) y la inclusión en vesículas o microesferas (Azizi y Díaz Mitoma, 2007).

El empleo del adyuvante apropiado juega un papel importante en el diseño de un candidato vacunal peptídico efectivo (Haro y col, 2003; Yano y col, 2005; Azizi y Díaz-Mitoma, 2007). La dosis y vía de administración del inmunógeno también juegan un papel importante en la respuesta inmune (Azizi y Díaz-Mitoma, 2007).

En el caso del VHA, Haro y col, (1995), administraron el péptido VP1 (11-25) correspondiente a dicha proteína de la cápsida del VHA a ratones, en diferentes formas: libre, incorporado en liposomas, conjugado a KLH e incorporado en un núcleo tetramérico de lisina. El péptido libre no generó respuesta de anticuerpos contra el VHA, pero el resto de las variantes si generó este tipo de respuesta, así como anticuerpos neutralizantes al virus. Los índices de neutralización máximos se obtuvieron con los líquidos ascíticos hiperinmunes de los ratones inmunizados con péptidos incorporados en liposomas y conjugados a KLH.

Bosch y col, (1998) identificaron un nuevo epítopo de la proteína VP3, aminoácidos del 110-121. La inmunización de ratones con dicho péptido incorporado en liposomas fue capaz de inducir en los mismos, anticuerpos anti-VHA, neutralizantes de la infectividad viral.

Pintó y col, (1998) evaluaron diferentes formas de incorporar el péptido de VP3 aa 110-121 a liposomas (encapsulado en liposomas, encapsulado en liposomas después de una derivatización con ácido palmítico y unido covalentemente a liposomas) obteniendo mejores resultados con la encapsulación del péptido que con su unión covalente. Estos

mismos autores evaluaron la inclusión de epítopos T al péptido evaluándose tres combinaciones diferentes, dos de ellas conteniendo epítopos T del virus de la hepatitis B y una, un epítopo del VHA (VP3, aa 102-121). Esta última combinación indujo un significativo aumento de la respuesta contra el epítopo de VP3, mientras que las otras dos combinaciones no indujeron aumento significativo de la respuesta. En este trabajo se evaluaron tres MAPs, uno compuesto por 4 moléculas de VP3 aa 110-121, otro por 4 de VP1 aa 11-25, y el último por dos moléculas de cada uno de los péptidos anteriores. Los mejores resultados se obtuvieron con esta última combinación. La incorporación de estas secuencias en liposomas es una estrategia útil para formular vacunas sintéticas que contengan más de un epítopo.

Haro y col, (2003) analizaron la respuesta de anticuerpos obtenida al inmunizar conejos con un MAP que contenía las secuencias peptídicas VP1 aa 11-25 y VP3 aa 102-121 utilizando adyuvantes de Freund o incorporadas en liposomas. Los anticuerpos presentes en el suero de los conejos presentaron una gran avidez y cifras de afinidad de aproximadamente un orden mayor para los péptidos incorporados en liposomas que para los administrados en presencia de adyuvantes de Freund. A partir de estos resultados los autores plantean que es posible utilizar dichos MAPs como inmunógenos y proponen la administración de los mismos con liposomas como una estrategia útil para el desarrollo de vacunas.

II.2. Tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos

II.2.1Características fundamentales de los fagos filamentosos

Los fagos filamentosos, entre ellos el M13, son largas partículas de aspecto filamentoso con un peso molecular de $12x10^6$ Da. Su genoma está compuesto por una molécula de Ácido

desoxirribonucleico circular de simple cadena, que tiene una longitud de alrededor de 6 400 nucléotidos e incluye 9 genes que codifican para diez proteínas, debido a que uno de sus genes, el 2, codifica para dos proteínas: la PII y la PX. Estas proteínas se clasifican en tres grupos: las de la cápsida (PIII, PVI, PVII, PVIII y PIX), las que participan en la replicación (PII, PV y PX) y las que intervienen en la morfogénesis (PI y PIV). La molécula de Ácido desoxirribonucleico se encuentra rodeada por la cápsida proteica de 6 a 10 nm de diámetro y 900 nm de largo, formada por, aproximadamente, 2 700 copias de la proteína mayoritaria PVIII y 5 copias de cada una de las proteínas minoritarias, agrupándose PIII y PVI en un extremo y PVII y PIX en el otro. La partícula viral no contiene lípidos ni carbohidratos (Rasched y Oberer, 1986).

Los fagos filamentosos infectan bacterias Gram negativas que expresan el pili F en la superficie celular. Estos bacteriófagos coexisten con el hospedero en un estado permanente de infección y no producen la lisis o muerte de la célula hospedera, la cual, una vez infectada, permanece aparentemente intacta, aunque su crecimiento se retarda con respecto a las células no infectadas (Rasched y Oberer, 1986).

II.2.2 Exposición de bibliotecas de péptidos en fagos filamentosos

El desarrollo de la tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos se basa en la capacidad de estos fagos de exponer, en su superficie, secuencias peptídicas foráneas fusionadas a las proteínas de la cápsida viral. La secuencia nucleotídica correspondiente a estos péptidos se inserta dentro del gen que codifica para alguna proteína de la cápsida del fago y de esta forma se expone el péptido de interés en la superficie viral. Si se insertan oligonucleótidos sintetizados al azar, las partículas virales que se obtienen exponen una biblioteca de péptidos, formada, al menos en teoría, por todas las combinaciones posibles

de aminoácidos que pueden darse para una talla determinada de los péptidos. Las proteínas virales más empleadas con este propósito han sido PIII y PVIII (Irving y col, 2001) aunque existe un reporte de exposición como fusión a la PVI (Jespers y col, 1995).

Las secuencias peptídicas expuestas en la superficie de la partícula viral son fácilmente accesibles y potencialmente capaces de unirse de manera específica a anticuerpos (monoclonales o policlonales), receptores, enzimas, células, etc. y por lo tanto pueden ser seleccionados sobre la base de dicha afinidad. La secuencia de un péptido de una biblioteca escogido por una determinada propiedad puede ser fácilmente deducida de la secuencia nucleotídica del fago que lo expone (Irving y col, 2001). De ahí que las bibliotecas de péptidos expuestos en fagos filamentosos constituyan una fuente de ligandos peptídicos con diferentes actividades biológicas (Gao y col, 2010).

Para péptidos pequeños (hasta seis aminoácidos) se emplean fagos recombinantes, o sea fagos que exponen todas las copias de PIII ó PVIII con un péptido foráneo fusionado. Para péptidos mayores es necesario utilizar partículas híbridas, en las cuales la cápsida viral está formada por una mezcla de PIII o PVIII nativas y recombinantes (Irving y col, 2001). Las estructuras peptídicas expuestas en fagos pueden ser lineales o cíclicas. La ciclización de los péptidos se lleva a cabo incluyendo cisteínas en diferentes regiones de las secuencias de interés con el objetivo de formar puentes disulfuros y de esta manera el péptido es presentado en forma de lazo (Luzzago y col, 1993). También se han construido bibliotecas de péptidos restringidos conformacionalmente insertando las estructuras peptídicas de interés dentro de la secuencia de una proteína con conformación restringida, de manera que funcionen como un andamio que limite el número de conformaciones que pueda adoptar dicho péptido (Santiago y col, 1993).

II.2.3 Aplicaciones de la tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos en el diseño de vacunas

La posibilidad de emplear las partículas de fagos como portadores inmunogénicos se ha demostrado. Estudios de inmunogenicidad en diferentes modelos animales empleando fagos portadores de mimotopos han demostrado la generación de respuesta inmune específica contra la secuencia peptídica expuesta en el fago (de la Cruz, 1988; Folgori y col, 1994; Prezzi y col, 1996; Houimel y Dellagi 2009; Menéndez y col, 2010; Zhong y col, 2011). La respuesta generada ha sido dependiente de células T y se ha demostrado la no necesidad de adyuvantes para la generación de la misma (Deroo y Muller, 2001; Henry y col, 2011). Los costos mínimos también figuran entre las ventajas de emplear fagos en experimentos de inmunogenicidad (Deroo y Muller, 2001; Gao y col, 2010).

Una de las aplicaciones más importantes de la tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos es la identificación de péptidos que actúen como miméticos inmunogénicos y sean capaces de inducir una respuesta de anticuerpos *in vivo* similar o idéntica a la utilizada para la selección del mimotopo (Wang y Yu, 2004).

La capacidad de un péptido de simular el comportamiento de un antígeno natural debe considerarse en dos niveles: simulación antigénica y simulación inmunogénica. Un péptido tiene la propiedad de simulación antigénica cuando es capaz de interactuar específicamente con el sitio de unión funcional al antígeno presente en el anticuerpo (paratopo) y de competir con el antígeno natural por su unión. Esto es lo que permite que un péptido de una biblioteca sea seleccionado con un anticuerpo determinado. En este caso el péptido seleccionado es un mimotopo antigénico del antígeno natural, capaz de simular las

propiedades de unión de un epítopo de un antígeno. La propiedad que permite que un péptido de una biblioteca sea seleccionado con un anticuerpo determinado es la antigenicidad (Deroo y Muller, 2001). Un péptido tiene la propiedad de simulación inmunológica cuando adicionalmente simula el comportamiento inmunológico del antígeno original. Esta condición es necesaria cuando la finalidad del trabajo es la utilización del péptido identificado como un candidato vacunal (Deroo y Muller, 2001; Van Regenmortel, 2001).

Aunque muchos de los trabajos publicados describen la selección de mimotopos empleando anticuerpos monoclonales, los anticuerpos provenientes del suero de pacientes también se han empleado exitosamente para identificar mimotopos como potenciales candidatos vacunales. El empleo de sueros humanos para el fin anterior tiene como basamento que a pesar de la diversidad de la respuesta inmune humoral que se genera a un agente etiológico en individuos diferentes, de modo general se produce un conjunto de anticuerpos comunes en la población afectada por una misma enfermedad (Folgori y col, 1994). La pesquisa de bibliotecas de péptidos expuestos en fagos filamentosos con anticuerpos del suero ha permitido identificar mimotopos antigénicos de agentes etiológicos involucrados en el desarrollo de una enfermedad y evaluar la inmunogenicidad de los mismos ya sea en el ambiente del fago (de la Cruz, 1988; Folgori y col, 1994; Prezzi y col, 1996; Houimel y Dellagi, 2009) o utilizando derivados sintéticos de la secuencia expuesta en el mismo (Keller y col, 1993; Stadler y col, 1999; Gazarian y col, 2013).

II.2.4 Identificación de epítopos específicos relacionados con enfermedades

La utilidad de los sueros policlonales para la identificación de epítopos específicos relacionados con enfermedades se puede deducir de los experimentos de Kay y col, (1993). Las IgG de ratón purificadas por afinidad a partir de un suero policlonal de carnero inducido contra las mismas, se emplearon para pesquisar una biblioteca de péptidos de 38 aminoácidos expuestos como fusión a la proteína PIII del fago filamentoso M13 y se lograron aislar 4 fagotopos cuyas secuencias coincidieron con la secuencia de la región Fc de las cadenas pesadas γ-2 y γ-3 de ratón.

El primer trabajo de este tipo utilizando sueros humanos demostró que es posible aislar mimotopos de antígenos implicados en una determinada enfermedad, empleando sueros humanos y bibliotecas de péptidos expuestos en fagos filamentosos y que no es necesario tener información previa acerca del agente causante de la enfermedad para aplicar esta tecnología (Dybwad y col, 1993).

Posteriormente, Folgori y col, (1994) desarrollaron una metodología que facilita la selección a partir de estas bibliotecas de ligandos reconocidos por sueros de individuos afectados por una determinada enfermedad y que no son reconocidos por sueros de individuos sanos. Dicha metodología se validó para la identificación de epítopos específicos de patógenos causantes de diferentes enfermedades infecciosas (Folgori y col, 1994; Prezzi y col, 1996; Zamit y col, 2009; Gazarian y col, 2013; Yang y col, 2013) y de antígenos característicos de algunas enfermedades autoinmunes (Kemp y col, 2010; Puccetti y col, 2010).

La importancia de la metodología desarrollada radica en que para su aplicación, no se requiere disponibilidad ni información acerca del agente etiológico, el cual puede ser desconocido. Esto representa un avance con respecto a los métodos para el desarrollo de vacunas y de sistemas de diagnóstico que necesitan información detallada acerca del agente causal de la enfermedad de interés, lo cual constituye una limitación en el estudio de las enfermedades infecciosas, alérgicas o autoinmunes, de agentes etiológicos desconocidos (Deroo y Muller, 2001).

Los péptidos que se seleccionan siguiendo esta metodología son imágenes positivas del antígeno natural y pueden ser inmunógenos sustitutos de este aún cuando sean completamente distintos del antígeno natural. Desarrollar péptidos pequeños capaces de sustituir al antígeno natural de forma tal que compitan con sus propiedades antigénicas e inmunogénicas es una de las grandes ventajas que ofrece esta tecnología (Deroo y Muller, 2001).

En aquellas enfermedades infecciosas en las cuales el patógeno es difícil de multiplicar en cultivo y los epítopos inmunodominantes son difíciles de definir debido a la escasez de anticuerpos específicos y/o antígenos, la pesquisa de bibliotecas de péptidos expuestos en fagos filamentosos con anticuerpos del suero de pacientes permite identificar marcadores peptídicos específicos de la enfermedad. En este caso las bibliotecas de péptidos expuestos en fagos constituyen una importante fuente alternativa de antígenos y abren nuevas perspectivas en el desarrollo de reactivos de nueva generación, de uso potencial en el diagnóstico o la prevención de estas enfermedades (Wang y Yu, 2004).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 Medios de cultivo

Medio de cultivo líquido Luria Bertani (LB): 5 g/L de cloruro de sodio, 16 g/L triptona, 10 g/L de extracto de levadura, pH 7,0-7,5 (BIOCEN, Cuba).

Medio de cultivo sólido LB: medio líquido de cultivo LB con agar bacteriológico (BIOCEN, Cuba), 15 g/L.

Medio de Crecimiento: Medio Dulbecco MEM (DMEM) (Gibco, Estados Unidos) con 10% de suero bovino fetal (SBF) v/v (Gibco, Estados Unidos) a 37 ºC y atmósfera de 5% de CO_2 .

Medio de Mantenimiento: Medio de crecimiento con 2 % de SBF .

III.2 Líneas celulares

Células de la línea FRhK-4 (ATCC CRL 1688, Estados Unidos) se propagaron en medio DMEM (Gibco, Estados Unidos) con 10% de suero bovino fetal (SBF) v/v (Gibco, Estados Unidos) a 37 ºC y atmósfera de 5% de CO_2.

III.3 Microorganismos

Fago filamentoso M13 K07 (Pharmacia, Suecia).

Cepa de *Escherichia coli* TG1 (K12_(*lac-pro*), *sup*E, *thi*, *hsd*D5/F' *tra*D36, *pro*A+B+, *lac*I^q, *lac*Z_M15 (Pharmacia, Suecia) (Hoogenboom y col, 1991).

El clon citopático HM175/18f del VHA (ATCC VR-1402, Estados Unidos) (Lemon y col, 1991).

III.4 Anticuerpos monoclonales

AcM 7E7, Clon 7E7, Mediagnost (Ping y Lemon, 1992)

III.5 Aspectos éticos de la investigación

A los voluntarios a los que se les extrajeron las muestras de suero se les informó del derecho de participar o no en el estudio y de retirar su consentimiento en cualquier momento, sin exponerse a represalias. Después de asegurar la comprensión de la información, se recogió por escrito, el consentimiento informado y voluntario (Anexo 1). Se les informó acerca de los objetivos, métodos, afiliaciones institucionales de los investigadores, beneficios calculados, riesgos previsibles e incomodidades derivadas del experimento. Se respetó la confidencialidad de la información, y las muestras sólo se utilizaron para lo que se previó originalmente. El estudio se aprobó por el Comité de Ética del Instituto Finlay (Anexo 2), y se actuó en conformidad con las leyes y reglamentos vigentes dictados por el MINSAP y el CITMA, que contemplan los principios enunciados en la Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial para las investigaciones médicas en seres humanos (OMS, 2008).

III.6 Sueros humanos

Las muestras de suero incluídas en este estudio se extrajeron a voluntarios de La Habana, adultos, de ambos sexos, en el año 2000. Las mismas se dividieron en dos grupos:

Grupo A: Se incluyeron 29 muestras positivas a la presencia de anticuerpos anti-VHA (se identificaron con la letra A) y se muestran en la Tabla 1.

Grupo B: Se incluyeron 23 muestras (se identificaron con la letra B) negativas a la presencia de anticuerpos totales anti-VHA (<15mUI/mL).

Todos los sueros fueron negativos al antígeno de supeficie del virus de la hepatitis B (AgsHB), virus de la hepatitis C (VHC) y virus de la inmunodeficiencia humana (VIH).

Tabla1. Sueros humanos incluídos en el Grupo A.

Sueros	**Anticuerpos anti-HAV**		
	Totales (mUI/mL)	**IgM**	**IgG**
A01	231 000	+	+
A02	235 000	+	+
A05	240 000	+	+
A06	80 000	+	+
A07	110 000	+	+
A08	610 000	+	+
A11	18 900	+	+
A12	214 000	+	+
A13	19 700	+	+
A16	229 000	-	+
A18	216 000	-	+
A21	161 000	+	+
A22	204 000	+	+
A23	131 000	+	+
A25	119 000	+	+
A26	78 000	+	+
A27	115 000	+	+
A28	119 000	+	+
A29	160 000	+	+
A30	178 000	+	+
A31	214 000	+	+
A32	144 000	+	+
A33	103 000	+	+
A35	128 000	+	+
A52	238 000	+	+
A53	220 000	-	+
A54	104 000	+	+
A55	138 000	+	+
AV1	NR	+	+

(+) presencia de anticuerpos, (-) ausencia de anticuerpos, (NR) No realizado

III.7 Biblioteca J404 de nonapéptidos expuestos en fagos

Como fuente de epítopos se escogió la biblioteca de péptidos presentados en fagos filamentosos (BPFF), J404, derivada del vector M13mp18 la cual fue donada gentilmente por el Dr. Jim Burrit (Universidad del Estado de Montana, Estados Unidos). Esta es una biblioteca lineal de péptidos (de nueve aminoácidos) que contiene $5x10^8$ fagos únicos, donde cada uno expresa una secuencia nonapeptídica diferente fusionada al extremo amino terminal de la proteína pIII de la cápsida del fago. La BPFF J404 tiene un gen de resistencia a la kanamicina que permite la selección de las colonias de *E.coli* TG1 infectadas por el fago (Burrit y col, 1996).

III.8 Selección por afinidad

La metodología seguida para identificar mimotopos del VHA empleando anticuerpos policlonales del suero es esencialmente similar a la descrita por Folgori y col, 1994, con algunas modificaciones. Brevemente, microperlas magnéticas acopladas a 100 μL de un anticuerpo anti-IgG humana obtenido en ratón (MACS, Miltenyi Biotec, Reino Unido), se bloquearon durante toda la noche a 4ºC en Solución salina tampón fosfato (SSTF)/ 0.1% Albúmina bovina sérica (ABS) p/v agitando suavemente. Después del bloqueo, las microperlas magnéticas se incubaron toda la noche a 4ºC con 30 μL del suero con mayor cantidad de anticuerpos totales contra el VHA (A08), se unieron a una columna magnética (Magnetic cell separator MiniMACS, Miltenyi Biotec, Reino Unido) y se lavaron 4 veces con SSTF/0.1% Tween 20 v/v. Posteriormente, las microperlas se liberaron de la columna y se bloquearon, durante 4h a 4ºC, con un exceso de partículas de fago M13K07 salvaje tratado con luz ultravioleta. A continuación se incubaron con 10^{12} unidades formadoras de colonia (UFC) de J404 BPFF toda la noche a 4ºC agitando suavemente, se aplicaron a la

columna magnética nuevamente y se lavaron 6 veces con SSTF/0.1% Tween 20 v/v. Después del lavado los fagos adsorbidos se eluyeron con 0.1 M glicina HCl, pH 2.2 y el eluato se neutralizó con Tris HCl 1M, pH 9.1. Los fagos eluídos se amplificaron en células de *Escherichia coli* cepa TG1 [K12, Δ (*lac-pro*), *supE, thi, hsdD5*/F' *traD*36, $proA^{+}$ B^{+}, $lacI^{q}$, *lacZ*ΔM15] (Hoogenboom y col, 1991). Una alícuota del fago eluído se tituló (Felici y col, 1991). Brevemente, diluciones en base 10 del fago se incubaron v/v con *E. coli* cepa TG1 en fase exponencial de crecimiento y se incubó durante 30 min a 37ºC sin agitación. Al cabo de este tiempo las bacterias infectadas con el fago se sembraron en placas con medio LB sólido conteniendo kanamicina (75 μg/mL) y estas se incubaron a 37ºC durante 16-24 h y se contaron las colonias.

III.9 Inmunoidentificación de colonias

Se realizó según Folgori y col, (1994). Para ello se colocaron discos de membrana de nitrocelulosa durante 4h a temperatura ambiente sobre placas que contenían aproximadamente 100 colonias de *E. coli* TG1 infectadas con los fagos seleccionados. Las membranas se incubaron con SSTF/0.1% Nonidet P40 (NP40) v/v/5% leche descremada, por 2h a temperatura ambiente, cambiando el tampón 4 veces. El segundo suero positivo del grupo A con mayores niveles de anticuerpos, A05, (dilución 1/50 en SSTF/0.1% NP40 v/v/5% leche descremada) se adsorbió 2h a temperatura ambiente con extracto de *E. coli* TG1 y fago M13K07 salvaje tratado con luz ultravioleta (Felici y col, 1996). Dicho suero se añadió a los discos de nitrocelulosa e incubó toda la noche a 4ºC agitando suavemente, seguido de 10 lavados con SSTF/0.1% NP40 v/v. Las membranas lavadas se incubaron con anti-IgG humana conjugada a fosfatasa alcalina (Sigma - Aldrich, Reino Unido), diluida 1:5000 en SSTF/ 0.1% NP40 v/v/ 5% leche descremada, durante 4h a 4ºC. Posteriormente

se lavaron con SSTF/0.1% NP40 v/v y la reacción se desarrolló durante 5 min en presencia de nitroazul de tetrazolio/ 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato (NBT/BCIP, del inglés *nitro-blue tetrazolium and 5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate*) (Pierce, Reino Unido).

III.10 Selección de fagos empleando Slot Blot

Se realizó según Prezzi y col, (1996). Brevemente, las colonias identificadas como positivas se inocularon en tubos que contenían 1 mL de medio LB líquido. Después de una incubación a 37ºC durante toda la noche, se centrifugó a 6000 g, 10 min a 4ºC. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo de cultivo, se incubó durante 20 min a 70ºC y se centrifugó a 6000 g, 30 min a 4ºC. El sobrenadante de los clones de fago y M13K07 (control negativo) se tituló y su concentración se ajustó a $7.5x10^7$ UFC/mL. Cincuenta microlitros de cada muestra se aplicaron a una membrana de nitrocelulosa en un equipo de Slot-Blot. Las membranas se incubaron con SSTF/0.1% NP40 v/v/ 5% leche descremada durante 2h a temperatura ambiente cambiando el tampón 4 veces. Los pasos siguientes se llevaron a cabo como se describe en la inmunoidentificación de colonias, pero en este caso se emplearon tres sueros negativos a anti-VHA (B04, B94, B95) y tres positivos con altos niveles de anticuerpos totales contra el virus y diferentes a los dos empleados en los pasos anteriores (A01, A02, A52).

III.11 Reactividad del panel de sueros con los clones de fago

Cada clon de fago se amplificó y purificó mediante una precipitación con polietilenglicol 8000/NaCl (Sambrook y Rusell, 2001). Los clones de fago y el fago M13K07 salvaje (control) se titularon y sus concentraciones se ajustaron a $2.5x10^{12}$ UFC/mL. Posteriormente los sueros del grupo A y B descritos previamente se utilizaron para evaluar la reactividad específica de los fagos frente a cada uno de ellos mediante ELISA (Folgori y

col, 1994). Se emplearon todos los sueros positivos excepto los que se agotaron en los pasos previos. Para ello, placas de 96 pozos (Maxisorp F8, Nunc) se recubrieron con 100 µL/pozo de AcM anti-M13 (Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido) (10 µg/mL en $NaHCO_3$ 50 Mm, pH 9.6). Las placas se incubaron durante toda la noche a 4ºC, se lavaron 3 veces con SSTF/ 0.1% Tween 20 v/v y se bloquearon con SSTF/0.1% Tween 20 v/v /5% leche descremada p/v durante 1 h a 37ºC. Posteriormente se adicionaron 100 µL/pozo de cada clon de fago y del fago control tipo salvaje y se incubaron 4h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 3 veces con SSTF/ 0.1% Tween 20 v/v y se añadieron 100 µL/pozo de las muestras de suero diluidas 1/100 y pre-adsorbidas con extracto de *E. coli* y fago M13K07 tratado con luz UV, 4h a temperatura ambiente. Las placas se lavaron 4 veces con SSTF/0.1% Tween 20 v/v, se incubaron 4h a 37ºC con 100 µL/pozo de anti-IgG humana conjugada con fosfatasa alcalina (Sigma - Aldrich, Reino Unido) diluida 1:5000. Posteriormente se lavaron y se añadió el sustrato p-nitrofenil fosfato para el desarrollo de la reacción. La absorbancia a 405 nm se registró mediante un lector de ELISA automático (Dinex Technologies, Reino Unido). Para cada suero se calcularon los valores promedio de dos experimentos independientes. Los valores se consideraron positivos cuando la razón de la absorbancia de los clones de fago entre la del control M13K07 (P/N) fue > 2.1 (Folgori y col, 1994).

III.12 Secuenciación del ácido nucleico de los fagos seleccionados y análisis de secuencias aminoacídicas

Se infectaron bacterias *E. coli* de la cepa TG1 en fase exponencial de crecimiento con una dilución apropiada de los fagos seleccionados previamente y se sembraron en placas de cultivo que contenían medio LB sólido con kanamicina (Sigma-Aldrich, Reino Unido) a 75

μg/mL. Las colonias aisladas se sembraron en medio LB líquido conteniendo kanamicina (75 μg/mL) durante toda la noche para proceder a la purificación del ácido nucleico de los clones de fago mediante el estuche Miniprep (QIA prep Spin, Miniprep, Estados Unidos).

El ácido nucleico de los fagos se secuenció empleando un cebador de 27 nucleótidos específico del gen III como describieron Burrit y col, (1995) utilizando el servicio de Macrogen, Inc.. Las secuencias aminoacídicas se dedujeron usando el programa GENERUNNER. Las secuencias peptídicas expresadas en el fago se alinearon con la región P1 de la poliproteína de cuatro cepas de VHA: HM-175, CR326, MBB y LA usando el algoritmo del Clustal W (Thompson y col, 1994).

III.13 Ensayo de competencia de los fagos seleccionados

El título de anticuerpos anti-VHA de cuatro sueros positivos (que hubieran reconocido los clones de fagos seleccionados en el ELISA descrito en el acápite III.11) y tres negativos, se midió antes y después de la adsorción de los mismos con cada uno de los clones de fagos seleccionados y el fago salvaje M13K07, empleando para ello el estuche competitivo semicuantitativo ETI-AB-VHAK-3 (DiaSorin, Italia). El ensayo se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La incubación de los sueros con los clones de fagos y el M13K07 (1:1 v/v, 10^8 UFC en 50 μL SSTF + 50 μL de suero sin diluir) se realizó durante 2 h a 37ºC, después de añadidas las muestras se midió la unión de anticuerpos anti-VHA al virus empleando el conjugado anti-VHA/peroxidasa de rábano picante (HRP). La absorbancia a 450 nm fue registrada por un lector de ELISA automático (Dinex Technologies, Reino Unido). Las muestras se evaluaron por triplicado y el experimento se desarrolló dos veces. El título de anticuerpos (mUI/mL) anti-VHA de los sueros, antes y después de la incubación con los clones de fago, se calculó a partir de la curva de

calibración del control positivo del estuche siguiendo las instrucciones del fabricante (se prepararon 5 calibradores mediante diluciones seriadas 1:2 v/v del suero control positivo desde 80 hasta 5 mUI/mL).

La fórmula empleada para calcular el porcentaje de inhibición de unión de los anticuerpos anti-VHA al virus debido a la adsorción de los mismos por los clones de fago fue la siguiente: % inhibición = 100- (100 x [A] / [NA]), donde: [A] es el título de anticuerpos después de la adsorción del suero con el fago y [NA] es el título de anticuerpos antes de la adsorción, calculados a partir de la curva de regresión del calibrador del estuche. Los clones de fago se consideraron positivos frente a un suero cuando la media del porcentaje de inhibición de unión de los anticuerpos anti-VHA al virus para el fago evaluado, fue mayor que la media del % inhibición de unión de los anticuerpos anti-VHA al virus, para el fago M13K07 + 3 veces la desviación estándar (DE) (Prezzi y col, 1996).

III.14 Síntesis de péptidos del VHA y conjugación a proteína portadora

La secuencia aminoacídica de los péptidos expuestos en los clones de fagos seleccionados se utilizó para sintetizar péptidos utilizando el servicio de Pierce, Reino Unido. A los mismos se les adicionó cisteína en su carboxilo terminal. Dichos péptidos se nombraron según el clon del cual procedían.

La conjugación de dichos péptidos a la proteína KLH se realizó según Harlow y Lane, (1988), con modificaciones. Brevemente, a una solución de KLH a 5mg/mL en SSTF pH 7.4 (Sigma, Estados Unidos) se le añadieron 200 μL de mono (lactosylamido) mono (succinimidil) suberato (Pierce, Reino Unido). La mezcla se incubó 30 min a temperatura ambiente y se realizó una filtración en gel empleando una columna de Sephadex G-50 equilibrada con SSTF pH 6.0. Doscientos cincuenta microlitros de péptido (5 mg/mL en

SSTF) se redujeron con ditiotreitol 0.5 M (BDH, Reino Unido), sometiéndose posteriormente a una cromatografía en columna de Sephadex G-10 equilibrada en SSTF pH 6.0. Posteriormente se mezclaron las soluciones de péptido con las de la KLH activada y se incubó 4h a temperatura ambiente, al cabo de las cuales se realizó una diálisis contra SSTF durante toda la noche. Los péptidos conjugados se nombraron según el clon del cual procedían.

III.15 Síntesis de MAP

Un MAP de cuatro ramificaciones (Figura 2) se sintetizó por el Laboratorio de Péptidos Sintéticos, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, Cuba, conteniendo dos de los mimotopos más inmunogénicos en el contexto del fago. Para la obtención del mismo primeramente se sintetizaron dos MAP de dos ramificaciones. Al carboxilo terminal de cada MAP se añadió un residuo de cisteína por donde se estableció una unión por puente disulfuro dando lugar al MAP heterodimérico de cuatro ramificaciones. La síntesis se desarrolló manualmente en fase sólida empleando la estrategia Fmoc/tBu (Field y Noble, 1990). Los MAPs de dos ramificaciones se purificaron por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) y se sometieron a un proceso de dimerización. La formación del heterodímero se confirmó mediante análisis por espectrometría de masas de ionización por *electrospray* (ESI-MS). El MAP heterodimérico de cuatro ramificaciones se purificó mediante HPLC. Se nombró de acuerdo a los mimotopos incluídos en él.

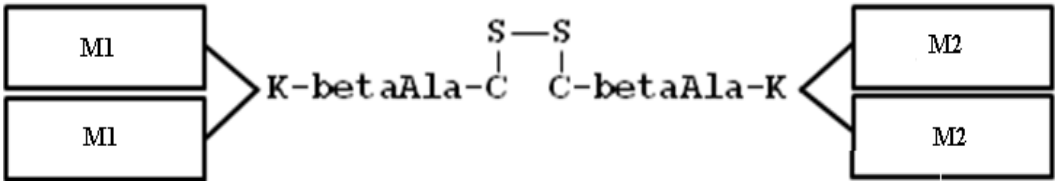


Figura 2. MAP que contiene la secuencia de dos mimotopos de VHA.

III.16 Concentración de proteínas

Se determinó mediante el estuche para determinación de concentración de proteínas (Pierce, Reino Unido) basado en el método del Ácido bicinconínico (Smith y col, 1985).

III.17 Inmunización de ratones

En todos los ensayos se emplearon animales de experimentación (ratones BALB/c, machos, 6-8 semanas de edad) provenientes del Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio avalados por un certificado de calidad.

Los experimentos se realizaron teniendo en cuenta los requerimientos legales de las autoridades nacionales conforme a los principios éticos según la Guía para el cuidado y empleo de animales de laboratorio dictados por la Comunidad Económica Europea (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 1987). La dieta suministrada consistió en pienso y agua *ad libitum*. Se garantizaron las condiciones higiénico sanitarias y las medidas epizootiológicas correspondientes para asegurar el buen estado de salud de los animales. Las extracciones de sangre por el plexo retroorbital y de líquido ascítico por punción abdominal se realizaron cumpliendo con las normas éticas establecidas.

III.17.1 Inmunización con los fagos

Los clones de fagos correspondientes a los mimotopos de VHA identificados y el M13K07 se procesaron y utilizaron para las inmunizaciones según lo descrito por de la Cruz y col, (1988) con modificaciones.

Los clones de fago se resuspendieron en SSTF a una concentración de 10^{12} UFC/mL, emulsionados 1:1 con adyuvante completo de Freund (ACF) y se inyectaron por vía intraperitoneal (i.p) en ratones BALB/c (5 por grupo, 0.1 mL/ratón) para la primera inmunización (día 0) y con adyuvante incompleto de Freund (AIF) para las

reinmunizaciones a los días 14 y 28. Se realizaron extracciones de sangre antes de cada inmunización y al día 42 por el plexo retroorbital. Se colectó el suero y se almacenó a -20ºC hasta su evaluación.

III.17.2 Inmunización con los mimotopos del VHA en diferentes formatos peptídicos

Se inmunizaron ratones BALB/c (5 ratones/grupo) por vía (i.p), con 10 y 100 μg respectivamente del MAP y los péptidos conjugados a KLH emulsionados 1:1 con ACF y se reinmunizaron con 10 y 100 μg de los antígenos emulsionados 1:1 en AIF a los días 14, 28 y 42. Los grupos controles se inmunizaron con SSTF y KLH incorporados en los adyuvantes ACF y AIF. Las muestras de suero se colectaron (del plexo retroorbital) antes de la primera inmunización (suero preinmune) y 14 días después de cada una de ellas y se conservaron a -20°C hasta su utilización.

Para la obtención de líquido ascítico hiperinmune (LAH), a las 48 h posteriores a la última inmunización, a los ratones se les inyectó 0,3 mL de 2,6,10,14-tetrametil pentadecano (Pristane; Sigma, UK) por vía i.p y cuatro días después se les inocularon $2x10^6$ células de mieloma de ratón SP2/O suspendidas en SSTF. Se incluyó un grupo de ratones sin inmunizar para la obtención de líquido ascítico negativo (LAN).

III.18 Ensayos de ELISA para la detección de anticuerpos en ratones inmunizados

III.18.1 Determinación de anticuerpos anti-péptido

Para la evaluación de la respuesta de anticuerpos anti-péptidos inducida por los péptidos conjugados a KLH y el MAP se empleó un ELISA similar al descrito por Haro y col, (2003). Placas de 96 pozos (Nunc Maxisorp F8) se recubrieron con los péptidos lineales a una concentración de 10 μg/mL y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron 3 veces con SSTF/0.05% Tween 20 v/v y se bloquearon con SSTF/0.05% Tween

20 v/v/ 3% leche descremada durante 1 h a 37ºC. Las muestras de sueros (diluciones 1/50) se adicionaron (100 µL/pozo) por duplicado y las placas se incubaron 2 h a 37ºC. Las placas se lavaron 3 veces con SSTF/0.05% Tween 20 v/v, y se incubaron 1 h a 37ºC con 100 µL/pozo de anti-IgG de ratón conjugada con HRP (Sigma - Aldrich, Reino Unido, diluido 1:5000). Después de lavadas las placas la reacción se desarrolló durante 15 min con sustrato ortofenilendiamina (OPD). La reacción se detuvo con H_2SO_4 0.1M y la Densidad óptica (DO) a 492 nm se registró mediante un lector de ELISA automático (Dinex Technologies, Reino Unido).

Las lecturas de DO 492 nm se analizaron para determinar las diferencias en los niveles de anticuerpos anti-péptidos inducidos en el tiempo después de inyecciones sucesivas del mismo inmunógeno. La razón DO del suero posinmunización (SPOS)/ DO del suero preinmune (SPRE), se empleó para determinar las diferencias en los niveles de anticuerpos anti-péptidos entre las dos dosis empleadas del mismo inmunógeno y entre los diferentes grupos.

III.18.2 Determinación de anticuerpos anti-VHA

La reactividad específica de las muestras de suero de los ratones inmunizados con los clones de fagos y los péptidos sintéticos se determinó mediante un ELISA indirecto, similar al descrito por Paramasivan y col, (2009). Para ello se recubrieron placas de 96 pozos (Nunc Maxisorp F8) con 100 µL de antígeno purificado de VHA (Mediagnost, Alemania) a razón de 10 µg/mL en $NaHCO_3$ 50 mM, pH 9.6 durante toda la noche a 4°C. Las placas se lavaron 3 veces con SSTF/0.05% Tween 20 v/v y se bloquearon con SSTF/0.05% Tween 20 v/v /3 % leche descremada p/v durante 1 h a 37ºC. Diluciones 1/80 de las muestras de suero de los ratones inmunizados con los fagos y 1/50 de los inmunizados con los

antígenos peptídicos se adicionaron (100 μL/pozo) por duplicado y se incubaron 2 h a 37ºC. Las placas se lavaron 3 veces con SSTF/0.05% Tween 20 v/v y se incubaron 1 h a 37ºC con 100 μL/pozo de anti-IgG de ratón conjugada con HRP (Sigma-Aldrich, Reino Unido, diluido 1:5000). Después de lavadas las placas la reacción se desarrolló durante 15 min con sustrato Tetrametilbencidina (TMB) (KPL, Estados Unidos) para el caso de las muestras de suero de ratones inmunizados con los fagos y OPD para los inmunizados con los antígenos peptídicos. La reacción se detuvo con H_2SO_4 0.1M y la absorbancia se registró mediante un lector de ELISA automático (Dinex Technologies, Reino Unido).

Se calculó la razón DO SPOS/ DO SPRE para cada ratón inmunizado con los clones de fago, los antígenos peptídicos y los grupos controles. Una razón ≥2 con respecto a los grupos controles se escogió como valor de corte para considerar una muestra de suero positiva a anticuerpos anti-VHA según Paramasivan y col, (2009).

III.19 Ensayo de neutralización

III.19.1 Titulación viral

El clon citopático HM175/18f del VHA (ATCC VR-1402, Estados Unidos) se multiplicó (Lemon y col, 1991) en células FRhK-4 y su título se determinó en placas de 96 pozos (Nunc, Fisher Scientific, Reino Unido) con monocapas confluentes de células FRhK-4 según el procedimiento descrito por Beales y col, (1986). Se inocularon 8 pozos con 50 μL del VHA (diluciones en base 10) en DMEM (GIBCO, Estados Unidos). Después de 1h de adsorción viral a 37ºC, se adicionaron 150 μL de DMEM/2% SBF v/v y las placas se incubaron durante 7 días a 37ºC en atmósfera de 5% CO_2 y se observaron al microscopio óptico diariamente para detectar la aparición de ECP. El título viral se calculó empleando el método de Reed y Muench, (1938).

III.19.2 Ensayo de neutralización del VHA

El ensayo que se realizó fue similar al reportado por Beales y col, (1996), el cual se basa en la inhibición del ECP como expresión de la inhibición de la multiplicación viral debido a la presencia de anticuerpos neutralizantes.

Se realizó un primer experimento para seleccionar los controles positivos y negativos del ensayo de neutralización. Se evaluaron las siguientes muestras:

- AcM neutralizante contra hepatitis A (AcM 7E7, Clon 7E7, Mediagnost), diluciones 1/20 y 1/40).
- Sueros humanos A12, A31 positivos a anticuerpos anti-VHA (conteniendo altos niveles de anticuerpos totales contra el virus y suficiente cantidad de los mismos para la realización del ensayo) y uno negativo a dichos anticuerpos (B1936).
- Suero y líquido ascítico de ratón negativos a la presencia de anticuerpos anti-VHA.

Estas muestras, así como los sueros humanos positivos y negativos a anticuerpos anti-VHA se diluyeron en base 2, desde la dilución 1/2 hasta 1/256 para su evaluación.

En un segundo experimento se evaluó la presencia de anticuerpos neutralizantes en los sueros de los ratones inmunizados que previamente resultaron positivos a anticuerpos anti-VHA por ELISA.

Para ambos experimentos la metodología empleada fue la siguiente: diluciones en base dos de los sueros posinmunización, controles negativos y controles positivos, se incubaron con un dilución fija del VHA (10^3 Dosis Infecciosas en Cultivo de Tejidos 50% ($DICT_{50}$) para los sueros de los ratones inmunizados con los fagos y 10^2 $DICT_{50}$/mL para los sueros de los

ratones inmunizados con los péptidos sintéticos). Cinco réplicas de cada muestra se inocularon en placas de 96 pozos sembradas con células FRhK-4 y se incubaron durante 1h a 37ºC. Pasado este tiempo las monocapas se lavaron 3 veces con SSTF y se adicionó DMEM conteniendo 2% SBF v/v como medio de mantenimiento. Las placas se incubaron por 7 días a 37ºC en atmósfera de 5% CO_2 y se observaron diariamente al microscopio óptico para determinar aparición de ECP.

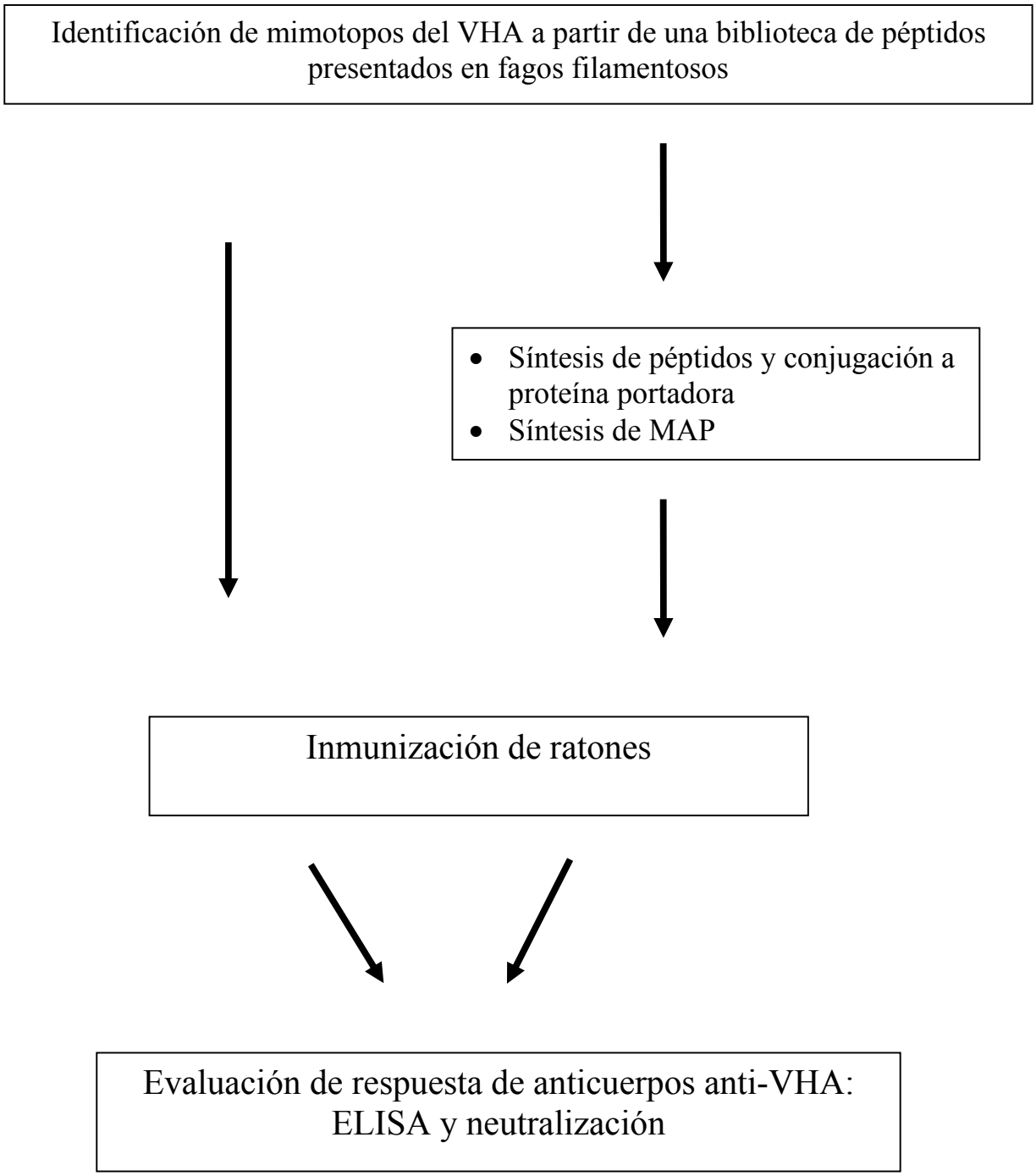
Para cada dilución se contabilizó el número de pozos con presencia de ECP sobre el total de pozos inoculados y se calculó el porcentaje. Cada dilución evaluada se consideró positiva a la presencia de anticuerpos neutralizantes si hubo una reducción de la multiplicación viral (ausencia de ECP) ≥50%. El título neutralizante del suero se determinó como el recíproco de la dilución de suero que redujo la multiplicación viral al 50%.

III.20 Análisis estadístico

El análisis estadístico se aplicó para evaluar la respuesta de anticuerpos anti-péptido inducida por los inmunógenos sintéticos y la anti-VHA inducida por los clones de fagos. La media de dos experimentos independientes se evaluaron para los ELISAs. Todos los datos directos o transformados (log10) pasaron la prueba de normalidad (Kolmogorov-Smirnov con Dallal-Wilkinson Lillie). Las diferencias en los niveles de anticuerpos anti-péptido inducidos por las construcciones peptídicas y dosis de las mismas evaluadas, así como la respuesta anti-VHA inducida por los clones de fagos se analizaron mediante la prueba paramétrica de Análisis de varianza de una vía (ANOVA). Las medias se compararon con la prueba de comparación multiple de Tukey, en estos experimentos los datos mostraron homogeneidad de varianza (prueba de Bartlett). Los datos para evaluar las diferencias en los niveles de anticuerpos anti-péptido, inducidos en el tiempo por el mismo inmunógeno

después de inmunizaciones sucesivas, no mostraron homogeneidad de varianza, incluso después de la transformación y se analizaron por la prueba no paramétrica de Friedman; las medianas se compararon con la prueba de comparación múltiple de Dunn. El paquete estadístico *GraphPad Prism* (San Diego, CA, USA, http://www.graphpad.com) se empleó para el análisis de los datos. Los valores de $p<0.05$ se consideraron significativos.

Flujo general de trabajo



IV. RESULTADOS

IV.1 Identificación de mimotopos del VHA

IV.1.1 Selección de fagotopos específicos al VHA

Al realizar la selección por afinidad, a partir de la biblioteca J404 empleando el suero A08, se eluyeron $2{,}4x10^3$ UFC/mL de los fagos adsorbidos. Esta ronda de selección por afinidad se amplificó a $1.5x10^{12}$ UFC/mL. Al realizarse posteriormente la inmunodetección de colonias empleando el suero A05, se identificaron como positivos 75 clones de fago (BA1), lo que representa el 50% de las colonias evaluadas. De los 75 clones se descartaron 68 que reaccionaron con los sueros negativos al evaluarse por Slot Blot; los restantes 7 clones fueron reconocidos por los sueros positivos y no por los negativos, estos clones fueron: BA1-03, BA1-06, BA1-46, BA1-51, BA1-53, BA1-54, BA1-56. Al finalizar la selección por afinidad y el Slot Blot se agotaron los sueros A01, A02, A05 y A08.

Los resultados obtenidos al evaluar la reactividad mediante ELISA de estos 7 clones de fagos con el panel de 23 sueros negativos se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Reactividad de los sueros negativos a anticuerpos anti-VHA con los clones de fago

Clones de fagos	P/T[a]	% Positividad
BA1-03	1/23	4.3
BA1-06	13/23	56.5
BA1-46	0/23	0
BA1-51	11/23	47.8
BA1-53	0/23	0
BA1-54	0/23	0
BA1-56	0/23	0

[a] Número de sueros negativos que reconocieron al clon de fago/Total de sueros evaluados

Los clones BA1-03, BA1-06 y BA1-51 fueron reconocidos por un 4.3, 56.5 y 47.8% de los sueros del grupo B respectivamente y se descartaron del estudio. BA1-46, BA1-53, BA1-54 y BA1-56 no reaccionaron con ninguno de los 23 sueros del grupo B (Tabla 2).

Tabla 3. Reactividad de los sueros del Grupo A con los fagotopos[a] BA1-46, BA1-53, BA1-54 y BA1-56 por ELISA.

Sueros	**BA1-46**	**BA1-53**	**BA1-54**	**BA1-56**
A06	1,1	1,4	2,5	1,8
A07	1,3	2,2	1,5	1,9
A11	1,5	1,3	1,6	2,2
A12	3,2	4,5	6,0	9,1
A13	1,3	1,2	1,7	2,3
A16	3,3	5,2	9,6	12,0
A18	2,3	1,9	2,3	3,2
A21	1,2	1,3	1,7	2,3
A22	1,4	1,4	1,9	2,2
A23	3,4	2,4	4,1	5,7
A25	3,0	1,0	2,0	3,0
A26	1,5	1,3	2,7	2,2
A27	3,1	3,5	5,6	5,7
A28	3,2	1,1	1,8	2,2
A29	3,3	4,2	4,3	5,3
A30	3,5	2,5	3,5	3,0
A31	2,7	1,8	2,7	2,7
A32	2,3	1,7	3,2	3,5
A33	4,0	2,0	2,1	3,1
A35	1,5	1,1	1,7	2,2
A52	1,5	1,1	2,0	2,2
A53	1,9	1,3	1,9	2,2
A54	2,4	1,3	1,9	3,7
A55	1,9	2,0	2,8	2,7
AV1	2,8	3,4	4,7	4,5

[a]Las celdas sombreadas indican reconocimiento del clon de fago por sueros del grupo A.
Los valores se consideraron positivos para P/N > 2.1 en relación con el fago salvaje.

Al evaluar los clones BA1-46, BA1-53, BA1-54 y BA1-56 con los sueros del Grupo A, se obtuvo que los mismos fueron reconocidos por estos sueros positivos a anti-VHA: BA1-46 y BA1-54 por el 56%, BA1-53 por el 28% y BA1-56 por el 92% (Tabla 3).

IV.1.2 Secuenciación del ácido nucleico de los fagos seleccionados y análisis de secuencias aminoacídicas

Las secuencias de aminoácidos que se obtuvieron para los péptidos expuestos en los clones de fago comparten varios aminoácidos con regiones de las proteínas VP1 y VP3 de las cuatro cepas del VHA analizadas: HM-175, CR326, MBB y LA. No se encontró similitud con las proteínas VP4 y VP2. La comparación de dichas secuencias con la región P1 de la cepa HM-175 (Cohen y col, 1987) se muestra en la Figura 3.

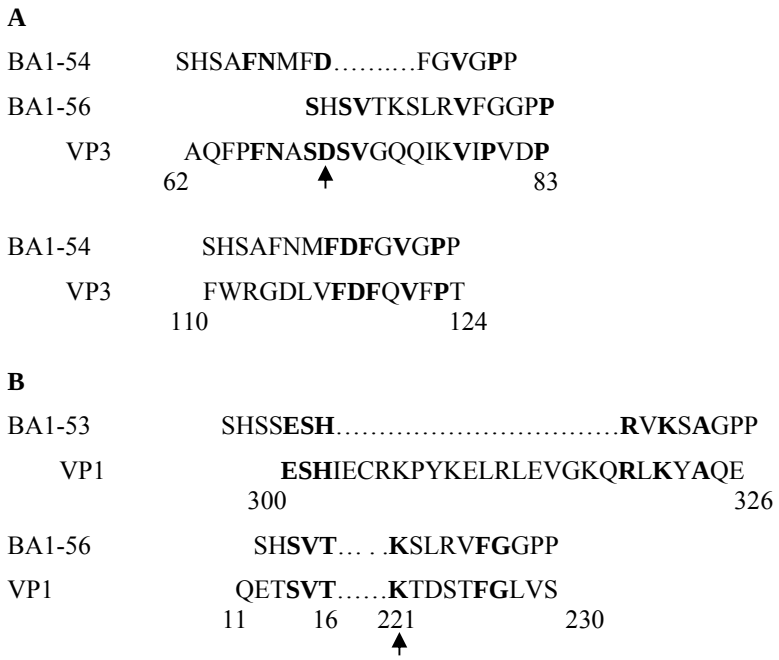


Figura 3. Secuencias de aminoácidos de los péptidos expuestos en los clones de fagos y alineamiento con la región P1 de la cepa HM-175 del VHA. (A) Alineamiento de BA1-54 y BA1-56 con la secuencia de la proteína VP3. (B) Alineamiento de BA1-53 y BA1-56 con la proteína VP1. Los números se refieren a las posiciones que ocupan los aminoácidos en dichas proteínas después del corte por la proteasa 3C. Las letras en negrita representan los residuos compartidos entre los péptidos expuestos y la proteína de VHA. Las flechas indican los sitios de mutaciones de escape a la neutralización: VP3 Asp70 y VP1 Lys^{221} (Nainan y col, 1992; Ping y Lemon, 1992).

Las secuencias expuestas en los fagos BA1-54 y BA1-56 mostraron similitud discontinua de aminoácidos con la proteína VP3 de la cápsida del VHA (Figura 3A).

La secuencia expuesta en el fago BA1-54 mostró similitud discontinua de aminoácidos con dos regiones de la proteína VP3, 5 residuos en la región del aa 66 al 80 y 5 residuos en la región del aa 117 al 123.

La secuencia expuesta en el fago BA1-56 también mostró similitud discontinua con 5 residuos de la proteína VP3 en la región del aa 69 al 83, lo que sugiere que los mimotopos BA1-54 y BA1-56 imitan dos epítopos discontinuos de la proteína VP3 de la cápsida.

No se detectó similitud entre la proteína VP3 y las secuencias expuestas en los fagos BA1-46 y BA1-53.

Las secuencias expuestas en los fagos BA1-53 y BA1-56 mostraron homología discontinua con dos regiones de la proteína VP1 de la cápsida de VHA (Figura 3B).

La secuencia expuesta en BA1-53 presenta 6 residuos homólogos con VP1 en las posiciones 300 al 302, 320, 322 y 324 y la expuesta en BA1-56 también mostró 6 residuos homólogos con VP1 en las posiciones 14 a la 16, 221, 226 y 227. Lo anterior sugiere que dichos mimotopos imitan dos epítopos discontinuos de la proteína VP1 de la cápsida.

No se detectó similitud entre VP1 y el mimotopo BA1-54.

La secuencia de aminoácidos de BA1-46 (SHSQLGPPVGPP) no presentó similitud con ninguna de las proteínas virales y tiene una secuencia hexamérica.

IV.1.3 Ensayo de competencia de los fagos seleccionados

La reactividad de los mimotopos presentados en los cuatro clones de fago con anticuerpos anti-VHA presentes en los sueros humanos se muestra en la Figura 4 y se expresa como el

porciento de inhibición de la unión de anticuerpos anti-VHA al virus en los sueros adsorbidos con los fagos, en comparación con los sueros no adsorbidos.

BA1-56, BA1-54 y BA1-53 inhibieron la unión de anticuerpos anti-VHA al virus en los cuatro sueros evaluados, mientras que BA1-46 sólo la inhibió en tres de ellos.

La inhibición de la unión de los anticuerpos al VHA por los cuatro fagotopos bajo estudio, fue mayor que la inhibición obtenida al absorber los sueros positivos con el fago salvaje M13K07 +3DE (el más alto de estos valores fue 21,7%). Como era esperado, no se detectó reacción con los sueros controles negativos.

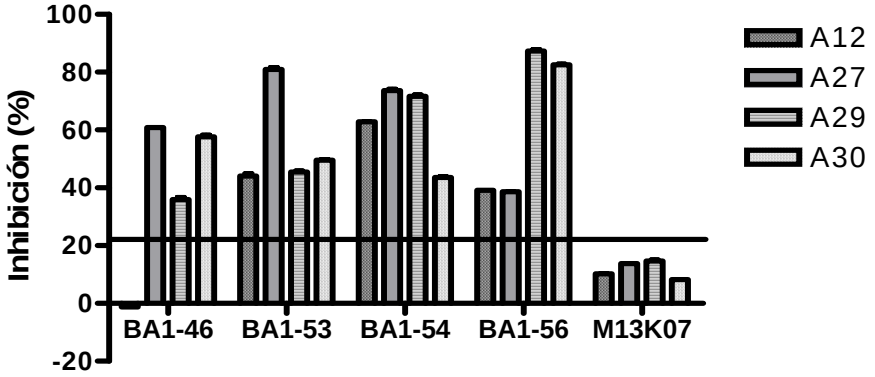
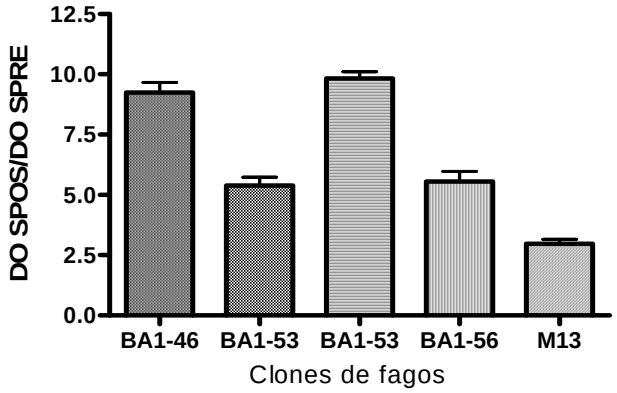


Figura 4. Inhibición de la unión de anticuerpos humanos anti-VHA al virus, por los cuatro mimotopos seleccionados. Se calculó la concentración de anticuerpos presentes en los sueros humanos antes y después de la adsorción con los clones de fagos, a partir de la curva de regresión del calibrador. La inhibición de la unión de anticuerpos anti-VHA al virus se calculó como: inhibición (%)= 100−(100×A/NA), donde A es la concentración de anticuerpos después de la adsorción con los fagos y NA es la concentración de anticuerpos antes de la adsorción. La línea paralela al eje de las X representa el valor más alto (21.7%) de las medias de la inhibición (%) de la unión de anticuerpos anti-VHA + 3DE, después de la adsorción con el fago salvaje.

IV.2 Evaluación por ELISA de la respuesta de anticuerpos anti-VHA inducida en ratones por los fagos.

Todos los animales inmunizados desarrollaron respuesta contra el VHA a los 42 días. Esta respuesta mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a la inducida por el fago salvaje ($p < 0.001$) al analizar las medias de los grupos empleando ANOVA y la

prueba de comparación múltiple de Tukey (Figura 5). Los clones BA1-54 y BA1-46 indujeron una mayor respuesta de anticuerpos que los clones BA1-56 y BA1-53, la menor respuesta fue la inducida por el fago salvaje.



	BA1-53	BA1-54	BA1-56	M13
1 BA1-46	***	ns	***	***
2 BA1-53		***	ns	***
3 BA1-54			***	***
4 BA1-56				***

Figura 5. Reactividad con el VHA de los sueros de los ratones inmunizados con los cuatro fagotopos y el fago M13. Los sueros colectados al día 0 y 42 se evaluaron por ELISA. Los resultados se expresan como la media ± DE de las razones de la DO SPOS/DO SPRE de los cinco ratones inmunizados. Las diferencias entre los grupos se indican en la tabla insertada en la figura: $p<0.001$***, ns: no existencia de diferencias significativas.

IV.3 Evaluación de la respuesta de anticuerpos inducida por los péptidos conjugados y el MAP.

Los péptidos que se sintetizaron comercialmente (Pierce, Reino Unido) presentaron más del 95% de pureza. Se nombraron 46, 53, 54 y 56 en dependencia del clon de fago del cual procedían. Los péptidos conjugados a KLH se nombraron: 46KLH, 53KLH, 54KLH y 56KLH.

En la síntesis del MAP heterodimérico de cuatro ramificaciones se emplearon los mimotopos 46 y 56 (con ellos se obtuvo mejor respuesta neutralizante en el contexto del

fago), el mismo se nombró MAP46-56 y se obtuvo con un 97,77% de pureza. La masa molecular determinada experimentalmente por ESI-MS fue 6043,24 Da.

IV.3.1 Inducción de anticuerpos anti-péptidos en el tiempo y en dependencia de la dosis

La evolución en el tiempo de la respuesta de anticuerpos anti-péptido dependió tanto de la dosis como de la naturaleza del inmunógeno (Figura 6A, B y C). En los grupos controles inmunizados con KLH y SSTF no se detectaron anticuerpos anti-péptido en ninguno de los tiempos evaluados ($P>0.05$). Para los grupos inmunizados con 10 μg de los péptidos conjugados a KLH, los anticuerpos anti-péptido solo se detectaron después de la cuarta inmunización (día 56) con respecto al suero preinmune y a las inmunizaciones previas ($p<0.05$). Con esta dosis del MAP46-56 no se detectaron anticuerpos. Todos los grupos de ratones inmunizados con 100 μg de los péptidos conjugados y el MAP46-56 indujeron anticuerpos contra los péptidos después de la tercera inmunización (día 42) ($p<0.05$), aumentando, al día 56, la respuesta de anticuerpos obtenida para los péptidos conjugados a KLH. Los anticuerpos obtenidos al día 56 fueron significativamente mayores que al día 42 (46KLH, $p<0.001$; 53KLH, $p<0.01$; 56KLH, $p<0.001$). Entre la tercera y la cuarta inmunización no se detectaron diferencias significativas en cuanto a la inducción de anticuerpos contra los péptidos 46 y 56 incluídos en el MAP. En cuanto a la comparación de las dos dosis empleadas, la de 100 μg además de inducir más pronto la respuesta de anticuerpos anti-péptidos para todos los inmunógenos evaluados, indujo los mayores niveles de anticuerpos ($p<0.05$) para 46KLH, 56KLH y los péptidos 46 y 56 incluidos en el MAP respecto a la dosis de 10 μg (Figura 7).

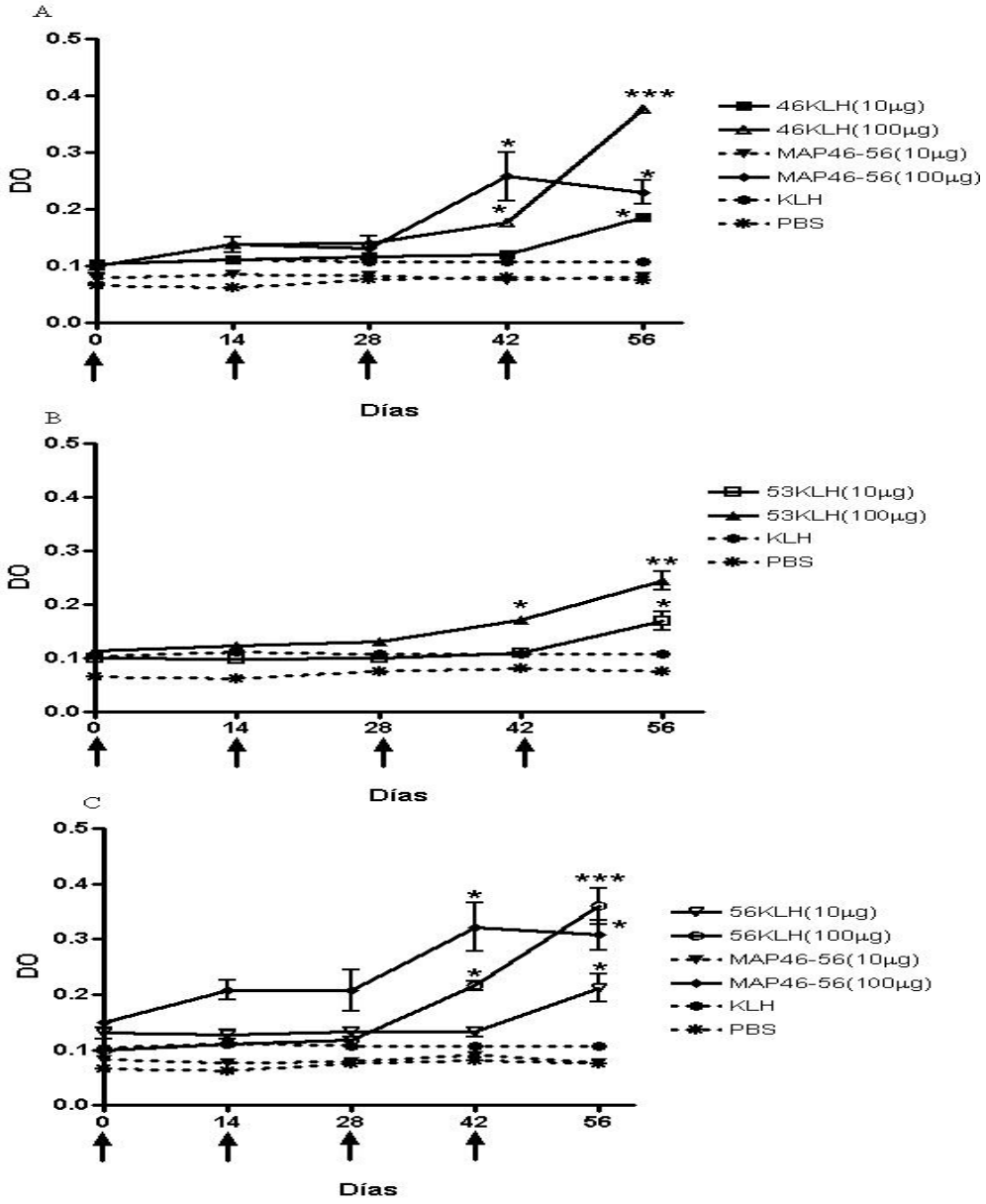


Figura 6. Respuesta inducida en el tiempo por los péptidos sintéticos conteniendo las secuencias aminoacídicas de los mimotopos de VHA. Las flechas indican los días de inmunización con 10 y 100 µg de los péptidos conjugados a KLH, MAP46-56, KLH y SSTF en ACF y AIF. Los resultados se expresaron como la mediana de la DO ± rango intercuartil. Las diferencias obtenidas se indican en la figura como: $p<0.05$*, $p<0.01$**, $p<0.001$*** al comparar con la inmunización anterior para el mismo grupo. A. Inducción de anticuerpos contra el péptido 46.B. Inducción de anticuerpos contra el péptido 53.C. Inducción de anticuerpos contra el péptido 56.

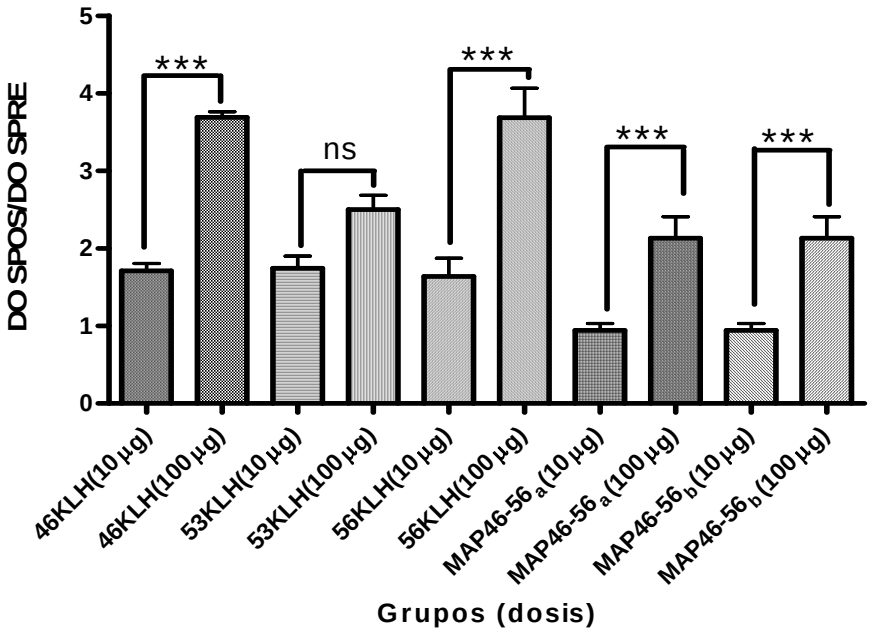
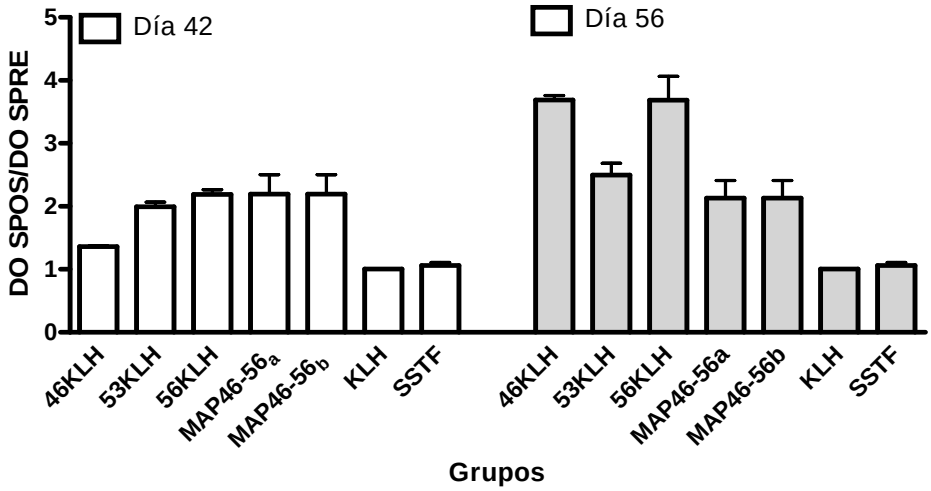


Figura 7. Respuesta de anticuerpos anti-péptidos inducida al día 56 en dependencia de la dosis (10 y 100 µg) de los péptidos conjugados a KLH y MAP empleados en las inmunizaciones. MAP46-56$_{a:}$ inducción de anticuerpos contra el péptido 46 por el MAP; MAP46-56$_{b:}$ inducción de anticuerpos contra el péptido 56 por el MAP. Los sueros se evaluaron por ELISA. Los resultados se expresan como la media ± DE de las razones de la DO SPOS/DO SPRE. Las diferencias se indican en la figura como $p<0.001$*** y ns: no existencia de diferencias significativas.

Los sueros de los ratones inmunizados con 100 µg de inmunógenos colectados al día 56 para los péptidos conjugados a KLH y a los días 42 y 56 para el MAP se seleccionaron para las evaluaciones posteriores. La respuesta de anticuerpos anti-péptido no pudo evaluarse para el 54KLH debido a una limitada cantidad del péptido 54 a emplear en los ensayos de ELISA.

IV.3.2 Comparación de la respuesta de anticuerpos anti-péptido entre los diferentes grupos

Los niveles de anticuerpos anti-péptidos inducidos con 100 µg de inmunógeno después de la tercera y la cuarta inmunización se muestran en la Figura 8.



	53KLH	56KLH	MAP46-56$_a$	MAP46-56$_b$
1 46KLH	*	ns	**	**
2 53KLH		*	ns	ns
3 56KLH			**	**
4 MAP46-56$_a$				ns

Figura 8. Niveles de anticuerpos inducidos por 100 µg de los péptidos conjugados y el MAP a los días 42 y 56 determinados por ELISA. MAP46-56$_a$: inducción de anticuerpos contra el péptido 46 por el MAP; MAP46-56$_b$: inducción de anticuerpos contra el péptido 56 por el MAP. Los resultados se expresan como la media ± DE de las razones DO SPOS/DO SPRE. Los grupos 46KLH, 53KLH, 56KLH y el MAP indujeron niveles de anticuerpos significativamente mayores que los grupos KLH y PBS a los días 42 y 56. No hubo diferencias significativas entre los grupos inmunogénicos al día 42. La comparación estadística de los niveles de anticuerpos inducidos en los grupos inmunogénicos al día 56 se muestra en la tabla insertada en la figura como: $p<0.05$*, $p<0.01$**, $p<0.001$*** y ns: no diferencias significativas ($p>0.05$).

Se observaron diferencias significativas ($p<0.05$) entre los niveles de anticuerpos inducidos por los péptidos conjugados a KLH y en el formato de MAP en comparación con los grupos controles (KLH y SSTF) a los 42 y 56 días. No se encontraron diferencias significativas entre los niveles de anticuerpos inducidos al día 42 por los diferentes inmunógenos. La comparación estadística de los niveles de anticuerpos anti-péptidos inducidos por estos grupos al día 56 se muestra en la tabla insertada en la Figura 8. Los niveles más altos los indujeron 46KLH y 56KLH, seguidos por 53KLH y ambos péptidos incluídos en el MAP46-56 (estos dos últimos inmunógenos tuvieron un comportamiento similar).

IV.3.3 Evaluación de la respuesta anti-VHA inducida por los dos formatos peptídicos.

La inducción de anticuerpos anti-VHA por los péptidos en estudio se muestra en la Tabla 4. Estos anticuerpos se detectaron en el suero de los ratones inmunizados con los cuatro péptidos conjugados comparados con el grupo control KLH.

Tabla 4. Inducción de anticuerpos anti-VHA en los ratones inmunizados con péptidos sintéticos conjugados con KLH y el MAP.

Antígeno	P/T[a]
46KLH	4/5
53KLH	2/5
54KLH	1/5
56KLH	3/5
MAP46-56	0/5
KLH	0/5
SSTF	0/5

[a] Número de ratones que mostraron anticuerpos anti-VHA al día 56 determinado por ELISA/Total de ratones inmunizados.

El péptido 46KLH indujo anticuerpos anti-VHA en mayor cantidad de ratones, seguido por el 56KLH. No se detectaron anticuerpos contra el virus en el suero de los ratones inmunizados con el MAP46-56.

IV.4 Ensayo de neutralización

IV.4.1 Selección de controles positivos y negativos del ensayo

En el experimento realizado para seleccionar los controles a emplear en el ensayo de neutralización, se obtuvo que todas las diluciones evaluadas del AcM 7E7 y del suero humano A12 neutralizaron 10^3 y 10^2 $DICT_{50}$/mL del VHA. El AcM 7E7 (dilución 1/40) mostró un 66,6% de neutralización y el suero A12 (dilución 1/256), un 100%. Ambos se

seleccionaron como posibles sueros a emplear como controles positivos en futuros experimentos. El suero humano A31 tuvo un título neutralizante de 2.67± 0.18. El suero negativo B1936, así como el resto de los controles negativos no mostraron actividad neutralizante en ninguna de las diluciones evaluadas.

IV.4.2 Evaluación de la respuesta neutralizante al VHA inducida por los mimotopos

Los anticuerpos inducidos por los cuatro mimotopos estudiados expuestos en los fagos, neutralizaron la infectividad del VHA. Los títulos neutralizantes de los mismos se muestran en la Tabla 5. El AcM 7E7 mostró un 66,6 % de neutralización. El suero preinmune y el obtenido a partir de los animales inmunizados con el fago salvaje no neutralizaron al virus en ninguna de las diluciones evaluadas.

Los péptidos conjugados con KLH no indujeron anticuerpos neutralizantes contra el VHA en los ratones inmunizados. Tampoco se detectaron anticuerpos neutralizantes contra el VHA en el líquido ascítico de los ratones sin inmunizar e inmunizados con KLH sin conjugar.

Tabla 5. Títulos neutralizantes anti-VHA de los sueros de los ratones inmunizados con los clones de fagos.

Clon de fago	Réplicas		Promedio+DE*
	1	2	
BA1- 46	16	18	17±1
BA1-53	4	6	5±1
BA1-54	6	10	8±2
BA1- 56	9	11	10±1

* Promedio y DE del título neutralizante calculado como el recíproco de la más alta dilución de suero capaz de reducir la multiplicación de la cepa HM175/f8 al 50%. El suero preinmune y el suero de los ratones inmunizados con el fago salvaje no presentaron anticuerpos neutralizantes. El AcM 7E7 empleado como control positivo presentó un 66,6% de neutralización a la dilución 1/40.

V. DISCUSIÓN

V.1 Identificación de mimotopos del VHA

Diferentes estudios han mostrado que péptidos expuestos en fagos filamentosos, seleccionados empleando anticuerpos producidos contra antígenos relacionados con determinadas patologías, pueden ser una herramienta importante tanto para el diagnóstico como para la prevención de enfermedades (Irving y col, 2001; Houimel y Dellagi, 2009; Menéndez y col, 2010; Garay y col, 2011; Alban y col, 2013; Gazarian y col, 2013; Yang y col, 2013). Estos péptidos no necesariamente tienen que tener similitud de secuencia con el antígeno, pero sí suficiente homología conformacional para inducir anticuerpos de alta afinidad capaces de unirse a ellos y al antígeno natural (Folgori y col, 1994). Esta metodología se empleó previamente para identificar mimotopos de diferentes virus (Folgori y col, 1994; Prezzi y col, 1996), pero no para el VHA.

En el presente trabajo se exploró por primera vez, la aplicación de una biblioteca de péptidos expuesta en fagos filamentosos y sueros humanos, para la identificación de péptidos que semejen la estructura antigénica de epítopos de VHA.

Como fuente de epítopos se utilizó la biblioteca de péptidos expresada en fagos filamentosos J404, derivada del vector M13mp18. Esta es una biblioteca lineal de péptidos al azar que contiene $5x10^8$ fagos únicos, donde cada uno expresa una secuencia nonapeptídica diferente fusionada al extremo amino terminal de la proteína pIII de la cápsida del fago. Esta biblioteca tiene la ventaja de un alto número de copias de la forma replicativa y un gen de resistencia a la kanamicina que permite la selección de las colonias de *E. coli* infectadas por el fago (Burrit y col, 1996).

El suero humano es una fuente valiosa de información de los antígenos que han estado en contacto con el organismo. Esta información existe en forma de respuesta inmune humoral y está dada por las moléculas de anticuerpos de diferente especificidad presentes en el suero. Emplear sueros humanos en la selección a partir de bibliotecas de péptidos, permite descifrar esta información, al poder identificarse determinantes antigénicos de los agentes causales de determinadas enfermedades, que sean inmunológicamente relevantes para el hospedero (Prezzi y col, 1996). Estudios realizados han sugerido que en los individuos afectados por una misma enfermedad se expresa un repertorio similar de genes de anticuerpos, por lo cual es posible identificar clones de fagos que sean reconocidos por anticuerpos comunes en la población seleccionada (Folgori y col, 1994).

El suero humano presenta anticuerpos policlonales los cuales son producidos por diferentes clones de linfocitos B, presentan diferente clase y afinidad y reconocen diferentes epítopos (Gavilondo, 1995). El empleo de sueros humanos positivos a anti-VHA nos resultó ventajoso, pues fue posible identificar cuatro mimotopos del virus que de haber empleado anticuerpos monoclonales, se hubiera identificado el epítopo de células B reconocido por dicho monoclonal (Folgori y col, 1994). Para la selección de los cuatro mimotopos de VHA se emplearon diferentes sueros, pues según recomendaron Folgori y col, (1994) y Prezzi y col, (1996), emplear diferentes combinaciones de sueros en los procesos de selección, aumenta la probabilidad de identificar un mayor número de epítopos virales diferentes.

Los sueros empleados en la selección presentaron altos niveles de anticuerpos totales contra el VHA, fueron positivos a anticuerpos IgM e IgG y se tomaron a partir de la cuarta semana de infección por lo cual podían tener anticuerpos neutralizantes, si tenemos en cuenta que los anticuerpos neutralizantes anti-VHA se detectan a partir de la cuarta semana de

infección viral (Zhou y col, 2012) y son tanto de clase IgM como IgG (Lemon y Binn, 1983). El empleo de sueros con estas características, en los procesos de selección a partir de bibliotecas de péptidos expuestos en fagos, permite identificar epítopos con potencial de inducir anticuerpos neutralizantes y respuestas protectoras (Prezzi y col 1996).

Por otra parte, cuando se emplean sueros en la selección, realizar múltiples pasos de la misma no necesariamente favorece el enriquecimiento de los fagotopos específicos en detrimento de los no específicos, debido a que en el suero pueden existir anticuerpos no específicos a la enfermedad que pudieran seleccionar fagotopos irrelevantes (Folgori y col, 1994). De ahí que se recomienda reducir el número de rondas de selección al mínimo (en muchos casos una ronda es suficiente) y evaluar por tamizaje una gran cantidad de los clones seleccionados para identificar cuál de ellos es positivo (Folgori y col, 1994; Prezzi y col, 1996).

Teniendo en consideración lo anterior, en el procedimiento que se empleó para identificar los mimotopos del VHA, se realizó una sola ronda de selección por afinidad, empleando un suero positivo que contenía un alto título de anticuerpos contra el VHA y se identificó la población de fagos obtenida después de esta selección por afinidad, empleando un segundo suero positivo a anticuerpos contra el virus.

La selección por Slot Blot, con un reducido panel de sueros, se realizó con el objetivo de facilitar la selección de clones antes de la evaluación por ELISA con el panel completo de sueros y así disminuir el laborioso trabajo de selección.

Un péptido que simula funcionalmente al epítopo nativo, es capaz de desplazar al antígeno natural, al unirse al paratopo del anticuerpo específico y esto puede demostrarse mediante un ensayo de competencia en el cual se empleen ambos (Wang y Yu, 2004). La inhibición

del reconocimiento del VHA por anticuerpos presentes en los sueros evaluados, después de la adsorción de los mismos con los clones de fago obtenidos al realizar el ensayo de competencia, soporta la hipótesis de que los péptidos expuestos en estos fagos mimetizan epítopos del VHA capaces de unirse al paratopo de los anticuerpos presentes en los sueros, compitiendo con el virus por la unión a los mismos. Las diferencias en la adsorción de los sueros a los clones de fago pudieran explicarse por la diferente frecuencia y afininidad de los anticuerpos contra el epítopo correspondiente en los sueros evaluados.

Teniendo en cuenta que el término mimotopo se definió como un péptido capaz de unirse al paratopo de un anticuerpo, aunque su secuencia no tuviera relación con la de la proteína del antígeno a partir del cual se indujo la producción del anticuerpo (Geysen y col, 1986), podemos afirmar que los clones de fago seleccionados son portadores de mimotopos del VHA, incluyendo el clon BA1-46 que no mostró similitud de secuencias con las proteínas estructurales del VHA. La secuencia de ese péptido se correspondió con un hexapéptido en lugar de un nonapéptido como se esperaba, razón por la cual la secuenciación se repitió tres veces y siempre se obtuvo el mismo resultado, lo que sugiere que se haya seleccionado un fago mutado.

El mimotopo BA1-46 tuvo la capacidad de ser reconocido por los anticuerpos anti-VHA presentes en sueros de individuos con hepatitis A y de inducir en ratones anticuerpos neutralizantes al virus. El criterio esencial para que se produzca la unión efectiva de un anticuerpo a un péptido es que la complementariedad entre el sitio de combinación del anticuerpo y la superficie molecular del péptido al que éste se une se mantenga en relación con la forma y la carga eléctrica. De ahí que un péptido al que se una un anticuerpo puede

definirse como un mimotopo, aun cuando él no sea una reproducción exacta del epítopo y no se conozca su secuencia de aminoácidos (Mattioli y col, 1995).

La ausencia de similitud de secuencia de BA1-46 con proteínas del VHA puede deberse a que sea un mimotopo conformacional y no uno lineal, si tenemos en cuenta que una secuencia consenso de un péptido puede no semejar ninguna región conocida de una proteína lineal cuando mimetiza una región discontinua que existe sólo en la superficie de una proteína correctamente foldeada (Burrit y col, 1995).

Tres de los mimotopos seleccionados mostraron homología de secuencia parcial con al menos una de las proteínas antigénicas de VHA, VP3 y VP1.

El mimotopo BA1-54 fue reconocido por el 56% de los sueros positivos, mostrando homología parcial con dos regiones de la proteína VP3 de la cápsida. La secuencia de aa 110-121 de VP3 es altamente conservada entre las cepas del VHA y se describió como un epítopo continuo del VHA (Bosch y col, 1998). Este mimotopo mostró homología con el motivo FDFXV de VP3 aa 117-121, el cual está implicado en la estructura de un epítopo presente en la proteína VP3 aa 110-121 si tenemos en cuenta que secuencias peptídicas más pequeñas presentes en la proteína VP3 aa 110-119, aa110-117, 110-116 y la repetición de la secuencia aa 111-116, no fueron reconocidas por sueros de individuos convalecientes (Bosch y col, 1998). A pesar de presentar algunos residuos de homología con VP3 aa 110-121, no se puede concluir que el mimotopo BA1-54 mimetice este epítopo lineal de la proteína VP3. Adicionalmente, se encontró homología parcial del mimotopo BA1-54 con la región del aa 66-80 de la proteína VP3, especialmente con la región alrededor del aa D^{70}, el cual es altamente conservado entre las cepas del VHA. VP3 D^{70} fue identificado por mutantes de escape a la neutralización y tiene un papel crítico en la estrucutura de un sitio

inmunodominante de neutralización del VHA (Nainan y col, 1992; Ping y Lemon, 1992). Como no existen datos cristalográficos de la estructura del VHA (Martin y Lemon, 2006), es difícil de predecir la semejanza estructural de BA1-54 con ambas regiones de homología de VP3.

El mimotopo BA1-53 mostró el más bajo reconocimiento por los sueros positivos (28%) y presentó similitud discontinua con la secuencia aa 300-324 de la proteína VP1.

El mimotopo BA1-56 fue reconocido por el 92 % de los sueros positivos. Este fue el único mimotopo que mostró homología parcial tanto con las proteínas VP1 como VP3. Mostró homología con el motivo SXSV de VP3 aa 69-72, y con el motivo de SVT de VP1. Un péptido sintético correspondiente a la región comprendida entre el aa 11-25 de VP1 el cual incluía el motivo SVT indujo anticuerpos neutralizantes contra el VHA (Emini y col, 1985). Un poliovirus quimérico que expresaba la secuencia aa 13-24 de la proteína VP1 indujo respuesta neutralizante (Lemon y col, 1992a). El BA1-56 también mostró homología parcial con la región aa 221-227 de VP1 incluyendo la K^{221}. Como en el caso del D^{70}, este residuo se identificó por mutantes de escape a la neutralización y está localizado en la partícula viral en un sitio neutralizalizante independiente (Ping y Lemon, 1992).

Resultados similares a los nuestros obtuvieron otros autores (Hughes y col, 1984; Ping y col, 1988) los cuales estudiaron dos anticuerpos monoclonales contra el VHA y ambos, reconocieron dos proteínas diferentes, VP1 y VP3, sugiriendo la presencia del mismo epítopo en ambas proteínas.

Si tenemos en cuenta que los intentos para determinar la estructura atómica de VHA por cristalografía de rayos X no han sido exitosos y que sólo se han obtenido imágenes de resolución media por criomicroscopía electrónica (Martin y Lemon, 2006), el análisis de

similitud de las propiedades físico-químicas de los residuos aminoacídicos no homólogos en la secuencia lineal es un elemento que puede ser importante en el análisis estructural. Como ejemplo tenemos que entre BA1-56 y los segmentos aa 68 – 83 de VP3 y aa 221-231 de VP1 del VHA se observaron similitudes en cuanto al tamaño, polaridad, carga neta y carácter alifático de los residuos aminoacídicos presentes en los mismos. Estas similitudes fisicoquímicas pudieran explicar el reconocimiento de los péptidos expuestos en los clones de fago por anticuerpos anti-VHA, en ausencia de una completa homología con la proteína original.

Sería interesante realizar experimentos futuros para dilucidar el significado funcional de la similitud discontinua de un péptido (BA1-56) con regiones de dos proteínas virales diferentes o la similitud de un péptido con dos regiones de la misma proteína (BA1-54 y BA1-56). Otros autores han explicado muchos aspectos del sistema de señales y tráfico intracelulares dirigidos por interacciones entre dominios de proteínas globulares y péptidos pequeños, estos dominios pueden unir múltiples péptidos que comparten un patrón de secuencia o "motivo lineal" (Neduva y col, 2005).

V.2 Evaluación de la capacidad de los mimotopos presentados en los clones de fagos de inducir anticuerpos anti-VHA en ratones

Si los péptidos seleccionados son capaces de adoptar conformaciones similares a regiones de las proteínas virales, se puede predecir que podrán inducir respuesta de anticuerpos que reconozcan al antígeno natural (Wilkinson y col, 2007).

La inmunización de ratones con los fagos portadores de los mimotopos indujo producción de anticuerpos anti-VHA en todos los animales a los 42 días posinmunización significativamente mayor que la respuesta inducida por el fago salvaje. Resultados

similares se obtuvieron por otros autores al evaluar fagotopos que mimetizaban antígenos del virus de la *Hepatitis B*, VHC y *Neisseria meningitidis* (Folgori y col, 1994; Prezzi y col, 1996; Menéndez y col, 2010).

Varios ensayos *in vitro* se han empleado para detectar anticuerpos neutralizantes anti-VHA (Lemon y col, 1997; Cao y col, 2008; Konduru y col, 2008; Azzizi y col, 2009). El ensayo de neutralización empleado en este trabajo es similar al ensayo de inhibición de ECP del VHA descrito por Beales y col, (1996), el cual es menos laborioso y más simple que el ensayo de inhibición de radioinmunofocos (RIFIT). Los anticuerpos inducidos en respuesta a los mimotopos presentados en los clones de fago no sólo se unieron específicamente al VHA, sino también neutralizaron su infectividad.

Las diferencias entre los títulos neutralizantes inducidos por los diferentes mimotopos puede deberse a diferencias en la inmunogenicidad o en la afinidad por los epítopos virales.

Por otra parte la secuencia de BA1-56 comparte tres residuos aa 14-16 con un péptido sintético aa 11-25 de VP1 del VHA, el cual indujo títulos neutralizantes (1/10) medidos por RIFIT (Emini y col, 1985). Bajos títulos de anticuerpos neutralizantes en sueros humanos pueden generar una eficiente protección (Stapleton y col, 1995). El BA1- 56 presenta además la K^{221} de VP1 y BA1-54 contiene el D^{70} de VP3, ambos residuos son críticos en la estructura del sitio neutralizante (Ping y Lemon, 1992). El mayor título neutralizante del AcM 7E7 comparado con el suero hiperinmune de ratón puede estar dado por su mayor concentración y pureza.

Los sueros de ratones inmunizados con el clon BA1-54 presentaron mayores niveles de anticuerpos anti-VHA, determinados por ELISA, que los inmunizados con BA1-56; mientras que los sueros de los ratones inmunizados con el clon BA1-56 tuvieron mayor

título de anticuerpos neutralizantes que los de los inmunizados con el BA1-54. Esto pudiera explicarse porque el ELISA es un ensayo no funcional que no evidencia directamente las funciones biológicas de los anticuerpos (Ochoa, 2013). En este ensayo inmunoquímico la capacidad de los anticuerpos de reconocer específicamente el antígeno depende de interacciones químicas entre el anticuerpo y el epítopo: fuerzas moleculares y atómicas y enlaces no covalentes (Van Regenmortel, 2001**).** Pudiera ser que en los sueros de los animales inmunizados con BA1-54 estén presentes anticuerpos inespecíficos o de baja afinidad capaces de reconocer al virus en el ELISA, sobrestimándose el resultado.

El ensayo de nuetralización se basa en una función biológica de los anticuerpos (Ochoa, 2013). Los anticuerpos neutralizantes más efectivos son los de más alta afinidad (Abbas, 2011). Los resultados sugieren que BA1-56 indujo mayores niveles de anticuerpos de alta afinidad que BA1-54.

V.3 Evaluación de la respuesta de anticuerpos anti-péptido inducida en ratones por los péptidos conjugados y el MAP

El poder de la tecnología de exposición de péptidos en fagos filamentosos, consiste en reducir antígenos proteicos complejos a pequeñas estructuras peptídicas, que retengan las propiedades biológicas de dichos antígenos, de forma tal que se comporten como sustitutos de los mismos. Confirmar la inmunogenicidad de estos mimotopos puede constituir un paso hacia la confirmación de posibles candidatos vacunales (Deroo y Muller, 2001).

En el presente trabajo además de comprobar la inducción en ratones de respuesta anti-VHA por los mimotopos expuestos en los fagos, también se evaluó la capacidad de los mismos de inducir este tipo de respuesta al ser presentados al sistema inmune en dos formatos peptídicos diferentes: como péptidos sintéticos conjugados a KLH y como MAPs

debido a que ambas construcciones peptídicas han sido valiosas para estudios de inmunogenicidad en el desarrollo de vacunas (Haro y col, 1995; Garay y col, 2011; Vincent, 2011; Schiavone y col, 2012). Las proteínas portadoras contienen epítopos de células T auxiliadoras por lo cual se genera un respuesta de anticuerpos dependiente de células T (Vincent, 2011) y los MAPs constituyen una alternativa a la conjugación a proteínas con un gran potencial como inmunógenos y vacunas sintéticas (Tam, 1995; Zhao y col, 2010; Vincent, 2011; Garay y col, 2011; Fujita y Taguchi, 2011; Zhang y col, 2013). Una de sus ventajas como inmunógenos es que tienen el peso molecular de una proteína pequeña, en donde el péptido representa más del 80% del total de la estructura, lo que permite superar la inmunodominancia y la ambiguedad química de las proteínas portadoras. Además la repetición de la secuencia peptídica en su estructura ha resultado en un mejoramiento del reconocimiento por las células B y en la especificidad, de los anticuerpos producidos, por el antígeno natural (Tam, 1995; Fujita y Taguchi, 2011).

Los anticuerpos anti-péptido se indujeron por las dos dosis de péptidos conjugados a KLH. Con la dosis de 10 μg se necesitaron 56 días para detectarlos, mientras que para la dosis de 100 μg se comenzaron a detectar a partir de los 42 días, obteniéndose la mejor respuesta al día 56. Las dosis de péptidos conjugados a KLH y esquemas empleados para la inmunización de ratones con el fin de obtener anticuerpos anti-péptido varían. En un estudio realizado por Haro y col, (1995) se evaluaron dos dosis (1,5 y 2,5 μg) de un péptido de VP1 aa 11-25 conjugado a KLH y sólo la dosis de 2,5 μg indujo anticuerpos anti-péptido, los mejores niveles de anticuerpos se alcanzaron a los días 49 y 56 posinmunización, en un esquema de 5 inmunizaciones a los días 0, 14, 21, 28 y 35. Una dosis de 50 μg fue suficiente para inducir, a los 42 días, anticuerpos contra un péptido

correspondiente a la proteína VP2 del virus causante de la enfermedad de Gumboro, en este esquema se realizaron tres inmunizaciones con intervalos de 14 días (Wang y col, 2005). Un péptido de la enterotoxina A de *Staphyloccocus aureus* (25 μg) indujo anticuerpos anti-péptido después de la segunda inmunización (35 días) y hasta después de la cuarta (94 días); en este esquema se realizaron tres inmunizaciones cada cuatro semanas (Vincent, 2011).

En el caso del MAP46-56 evaluado en este trabajo, la dosis de 100 μg fue la única que indujo anticuerpos anti-péptido, detectándose a los 42 y 56 días. Al igual que para los péptidos conjugados a KLH se han empleado diferentes dosis y esquemas para inducir anticuerpos anti-péptido en ratones al inmunizar con MAP (Zhao y col, 2010; Garay y col, 2011). En el trabajo realizado por Haro y col, (1995) se describe que el péptido de VP1 aa 11-25 del VHA sintetizado como un MAP de cuatro ramificaciones indujo anticuerpos anti-péptido a los 49 días posinmunización sólo con la dosis más alta de las tres evaluadas (10, 50 y 100 μg). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo al inmunizar con el MAP46-56 fueron similares a los obtenidos por estos autores, aunque el número e intervalo entre las inmunizaciones empleados en ambos experimentos no fue el mismo.

La inducción de anticuerpos, más rápida y a dosis más bajas, por los péptidos conjugados a KLH estudiados, pudiera explicarse por la presencia de epítopos de células T auxiliadoras en dicha proteína.

V.4 Evaluación de la respuesta de anticuerpos anti-VHA inducida en ratones por los péptidos conjugados y el MAP

La inducción de respuesta inmune específica de reactividad cruzada con el antígeno natural al inmunizar con péptidos-mimotopos seleccionados con anticuerpos a partir de bibliotecas

de péptidos expuestos en fagos, ha creado expectativas para el empleo de los péptidos como sustitutos del antígeno natural (Keller y col, 1993; Wang y col, 2005; Garay y col, 2011).

Es de aceptación general que altos títulos de anticuerpos anti-péptidos presentarán reactividad cruzada con la proteína nativa, si la conformación del péptido que se emplea como inmunógeno es semejante a la del segmento correspondiente en dicha proteína (Deroo y Muller, 2001; Van Regenmortel, 2001; Wilkinson y col, 2007). Sin embargo, es imposible predecir la conformación que adoptará el péptido al estimular la producción de anticuerpos por las células B. Producir anticuerpos antipéptido con el grado requerido de reactividad cruzada con la proteína nativa es, en gran medida, una empresa de éxito y error (Van Regenmortel, 2001).

Los anticuerpos anti-VHA solo se indujeron por los péptidos conjugados a KLH. La mejor respuesta la indujo el 46KLH seguido por el 56KLH. Una característica importante del sistema MAP es la posibilidad de incorporar múltiples copias de dos o más epítopos en la misma construcción peptídica, lo cual resulta en una molécula multiepitópica que potencialmente puede conducir a una mejor respuesta (Amexis y Young, 2007; Vincent, 2011; Zhang y col, 2013). El MAP46-56 heterodimérico contiene los dos mimotopos que indujeron la mejor respuesta neutralizante en el ambiente del fago. La incorporación de estos mimotopos en el MAP no resultó en un mejoramiento de la respuesta immune ya que no se detectaron anticuerpos anti-VHA. Pintó y col, (1998), encontraron que la inclusión de dos epítopos de las proteínas VP3 y VP1 de VHA en un MAP indujeron mejor respuesta en comparación con el MAP compuesto por uno sólo de estos epítopos. El diferente comportamiento de los péptidos conjugados a KLH respecto a su incorporación en el MAP, pudiera deberse a que como se ha planteado, la razón más importante del fallo en la

inmunogenicidad de los péptidos, es la multitud de conformaciones que éstos adoptan llevando a una baja concentración de las conformaciones necesarias para inducir la respuesta inmune específica contra el antígeno (Deroo y Muller, 2001; Wilkinson y col, 2007). Este planteamiento lo avalan resultados obtenidos por varios autores en los cuales, a pesar de obtenerse altos títulos contra los péptidos empleados como inmunógenos, sólo parte de esta respuesta ha sido de reactividad cruzada con el antígeno (El Kasmi y col, 1999; Joyce y col, 2002; Niederhäuser y col, 2008; Zamit y col, 2009).

Las difencias entre la inmunogenicidad de los péptidos conjugados y el MAP, también pudiera atribuirse a la KLH, la cual porta epítopos de células T auxiliadoras, que pueden contribuir a un aumento de la inmunogenicidad de los péptidos sintéticos. Haro y col, (1995), encontraron la conjugación a KLH de un péptido correspodiente a la proteína VP1 del VHA como una mejor opción para obtener anticuerpos contra el virus que el MAP tetramérico compuesto por el mismo, lo que atribuyeron a la presencia de epítopos T presentes en la KLH. En un estudio posterior, Pintó y col, (1998), obtuvieron un aumento en la inmunogenicidad de un péptido sintético que contenía un epítopo de la proteína VP3 del VHA incorporado en liposomas y lo atribuyeron a la presencia de epítopos de células T auxiliadoras adyacentes al epítopo B en dicha secuencia peptídica. Un MAP multiepitópico incorporado en liposomas que contenía esta secuencia fue considerado como un método robusto para el diseño de vacunas contra el VHA (Haro y col, 2003). La incorporación de un epítopo promiscuo de células T auxiliadoras (secuencia P2) del toxoide tetánico en un MAP conteniendo un epítopo de células B de *Neisseria meningitidis*, indujo altos niveles de anticuerpos anti-péptidos y anticuerpos bactericidas en comparación con el MAP compuesto únicamente por el epítopo B (Garay y col, 2011). En estudios comparativos

sobre el uso de péptidos conjugados a KLH y MAPs como inmunógenos, los primeros se han considerado como una mejor opción para inducir respuesta de anticuerpos específicos (Haro y col, 1995; Vincent, 2011). Otros autores han encontrado el sistema de MAPs como mejores inmunógenos que la conjugación de péptidos a proteínas portadoras (Amexis y Young, 2007; Garay y col, 2011). También se ha descrito, que aunque el sistema MAPs resulta en altos títulos de anticuerpos anti-péptido, los mismos han sido incapaces de reconocer a la proteína nativa (McLean y col, 1991; Mahale y col, 1996).

V.5 Diferencias en la inmunogenicidad de los péptidos en los dos formatos peptídicos y en el contexto del fago

Se ha obtenido respuesta neutralizante al inmunizar con péptidos sintéticos seleccionados empleando la tecnología de exposición en fagos filamentosos (Keller y col, 1993; Stadler y col, 1999; Wang y col, 2005). Estos resultados avalan el uso de las bibliotecas de fago para desarrollar péptidos pequeños como sustitutos del antígeno. Los resultados obtenidos evidencian que al inmunizar ratones con los péptidos conjugados a KLH no se reprodujo el resultado obtenido al inmunizar los mismos con los fagos portadores del mimotopo. La no coincidencia de la conformación adoptada por los péptidos sintéticos con la que presenta el mimotopo correspondiente expuesto en el fago pudiera explicar este resultado.

La reducción de la secuencia del inserto del fago a un péptido pequeño que pueda competir con las propiedades antigénicas e inmunogénicas del antígeno natural, encara diferentes dificultades. El cambio del ambiente de la secuencia expuesta en el fago tiene una influencia en la conformación del epítopo y por tanto en sus propiedades inmunogénicas (Deroo y Muller, 2001). En un estudio realizado por El Kasmi y col, (1999) se consideró la no coincidencia de la conformación del mimotopo expresado en el fago con la de la

construcción sintética como la posible explicación del fallo inmunogénico. Meola y col, (1995) estudiaron la inmunogenicidad de mimotopos de AgsHB expresados en diferentes ambientes y observaron que el mimotopo fue más inmunogénico cuando se expresó en el ambiente en el cual se seleccionó. Otra razón pudo haber sido la multitud de conformaciones que adoptan los péptidos llevando a una baja concentración de las conformaciones necesarias para inducir la respuesta inmune específica contra el antígeno (Deroo y Muller, 2001; Wilkinson y col, 2007).

La diferente inmunogenicidad entre los péptidos sintéticos y expuestos en los fagos pudiera explicarse también por las ventajas que ofrece el fago como portador inmunogénico sobre las proteínas que tradicionalmente se usan para este fin (Irving y col, 2001; van Houten y col, 2006; Su y col, 2007; Henry y col, 2011). Se ha encontrado una respuesta de anticuerpos más enfocada al péptido que al portador inmunogénico, cuando éste se presenta en el contexto fago que cuando se encuentra conjugado a la ovoalbúmina (van Houten y col, 2006), lo cual pudiera deberse a una relativa menor complejidad de la superficie del fago, el cual presenta una menor cantidad de epítopos B en las proteínas de la cápsida en comparación con los que presenta la ovoalbúmina (van Houten y col, 2006; van Houten y col, 2010).

Por otra parte, la naturaleza particulada de los fagos les pueden conferir propiedades adyuvantes (Irving y col, 2001). La respuesta de anticuerpos dirigida a los epítopos expuestos en los viriones de fagos filamentosos es dependiente de células T (Irving y col, 2001; Gaubin y col, 2003).

El uso de fagos como vehículos para la presentación de antígenos que generen respuesta inmune en humanos no ha sido aprobado. El hecho de que se hayan empleado en humanos

como agentes antibacterianos hace que existan precedentes de su empleo y que se hayan acumulado datos con respecto a su ausencia de toxicidad, de manera que la posibilidad de la elaboración de vacunas para humanos basadas en bacteriofagos en general y en fagos filamentosos en particular, pudiera ser posible (Menéndez, 2004).

El hecho de que el MAP no haya inducido anticuerpos anti-VHA y de que los péptidos conjugados a KLH no hayan inducido anticuerpos neutralizantes contra el virus, a diferencia de cuando son presentados en el contexto del fago, indica que la capacidad de los péptidos miméticos estudiados de estimular la inducción de anticuerpos específicos anti-VHA depende del contexto molecular en el cual se presentan al sistema inmune.

Varias estrategias se han utilizado para mejorar la inmunogenicidad de los péptidos. La inclusión de epítopos de células T auxilidoras en las diferentes construciones peptídicas ha mostrado muy buenos resultados (Deroo y Muller, 2001; Azizi y Díaz-Mitoma, 2007; Garay y col, 2011). El uso de adyuvantes potentes es un elemento de gran importancia para este fin (Azizi y Díaz-Mitoma, 2007). Debido a los efectos del tamaño, carga eléctrica y la hidrofobicidad que regulan la incorporación de proteínas en la formulación del adyuvante y además a las modificaciones que puede sufrir el epítopo en la formulación, es difícil de predecir que adyuvante funcionará más eficazmente con una proteína o péptido particular (Deroo y Muller, 2001; Petrovsky y Aguilar, 2004; Azizi y Díaz-Mitoma, 2007).

Zhou y col, (2012) documentaron un papel dominante y no reconocido previamente, de las células T CD4+ en el control de la infección por VHA. Estas células produjeron citoquinas como IFN-γ, IL-2, e IL-21 en la cuarta semana posinfección, momento en que la replicación viral declina bruscamente. No se detectó producción de IL-4, IL-13, IL-17 e IL-22. Este estudio no se realizó con el objetivo de determinar el patrón de respuesta inducido,

pero las citoquinas encontradas por estos autores ante la infección por VHA, se relacionan con un patrón de respuesta Th1 (Abbas, 2011).

Tomando lo anterior en consideración, así como las estrategias descritas en la literatura para aumentar la inmunogenicidad de los péptidos y teniendo en cuenta que los péptidos conjugados a KLH (la cual contiene epítopos de células T auxiliadoras), indujeron anticuerpos anti-VHA, no descartamos un posible aumento de la inmunogenicidad del MAP estudiado con la inclusión de epítopos de células T auxiliadoras en el mismo. Por otra parte, la evaluación de adyuvantes que favorezcan la inducción de respuesta de anticuerpos, específica al antígeno natural pudiera contribuir también a aumentar la inmunogenicidad de los péptidos sintéticos evaluados.

Sería interesante evaluar la inmunogenicidad de las secuencias aminoacídicas expuestas en los clones BA1-54 y BA1-53 en el formato de MAP; particularmente la secuencia correspondiente a BA1-54 la cual contiene el aminoácido D^{70} de VP3 el cual es un residuo que juega un papel crítico en la estrucutura del sitio inmunodominante de neutralización de VHA (Nainan y col, 1992; Ping y Lemon, 1992).

El empleo de una biblioteca de péptidos expuestos en fagos permitió identificar, por primera vez, péptidos que simulan epítopos biológicamente relevantes del VHA, basado en el reconocimiento por anticuerpos contra el virus presentes en sueros humanos. Estos mimotopos pudieran ser de aplicación en el desarrollo de medios diagnósticos y vacunas.

Las características de los sueros empleados en el proceso de selección nos permitió identificar cuatro secuencias aminoacídicas capaces de inducir anticuerpos neutralizantes contra el VHA en ratones, al ser presentadas al sistema inmune expuestas en fagos filamentos, lo que sugiere que pueden ser útiles en el desarrollo de un candidato vacunal

contra hepatitis A.

Lograr reproducir en un formato peptídico, la conformación e inmunogenicidad que dichos mimotopos presentan en el ambiente del fago, nos encaminará hacia el empleo de los mismos como sustitutos del antígeno natural, lo que evitará el costo y el riesgo biológico que implica la multiplicación y manipulación del virus.

VI. CONCLUSIONES

- Con el empleo de una biblioteca de péptidos expuestos en fagos filamentosos y sueros humanos positivos a anticuerpos contra el VHA fue posible identificar cuatro mimotopos de dicho virus, de los cuales tres presentan similitud aminoacídica con al menos una de las proteínas antigénicas VP1 y VP3.
- La capacidad de los cuatro mimotopos identificados de inducir anticuerpos específicos anti-VHA depende del contexto molecular en que se presentan al sistema inmune.
- La capacidad de los cuatro mimotopos presentados en los fagos filamentosos de inducir anticuerpos neutralizantes anti-VHA, los hace de interés vacunal.

VII. RECOMENDACIONES

- Determinar el patrón de respuesta inducido por los inmunógenos evaluados
- Diseñar, sintetizar y evaluar MAPs incluyéndole epítopos de células T auxiliadoras.
- Evaluar la capacidad de otros adyuvantes para inducir anticuerpos anti-VHA al emplear dichos MAPs y los péptidos conjugados a KLH como inmunógenos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. Effector mechanisms of humoral immunity. En: Elsevier/Saunders (eds). Cellular and molecular immunology. Seventh Edition. Philadelfia: Estados Unidos. 2011; 269-292.
- Aguiar P. Comportamiento epidemiológico de la hepatitis A en Cuba. Reporte técnico de vigilancia.2004; 9:3.
- Alban SM, de Moura JF, Minozzo JC, Mira MT, Soccol VT. Identification of mimotopos of Mycobacterium leprae as potential diagnostic reagents.BMC Inf Dis.2013;13:42.doi:10.1186/1471-2334-13-42.
- Amado LA, Marchevsky RS, de Paula VS, Hooper C, da S Freire M, Gaspar AMC y col. Experimental hepatitis A virus (HAV) infection in cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*): evidence of active extrahepatic site of HAV replication. Int J Exp Pathol. 2010; 91: 87–97.
- Amexis G, Young NS: Multiple antigenic peptides as vaccine platform for the induction of humoral responses against dengue-2 virus. Viral Immunol 2007; 20:657-663.
- Anderson DA y Ross BC. Morphogenesis of hepatitis A virus: isolation and characterization of subviral particles. J Virol.1990; 4:5284-5289.
- André FE. Approaches to a vaccine against hepatitis A: development and manufacture of an inactivated vaccine. J. Infect. Dis. 1995; 171: 33-39.
- Anuario estadístico, MINSAP, Cuba, 2011.
- Azizi A, Díaz-Mitoma F. Viral peptide immunogens: current challenges and opportunities. J Pept Sci. 2007; 13:776-786.
- Azizi A, Sirskyj D, Weltzin R, Anderson DE, Diaz-Mitoma F. Rapid detection of anti-hepatitis A virus neutralizing antibodies in a microplate enzyme immunoassay. Journal of Medical Microbiology. 2009; 58: 1433–1436
- Beales LP, Wood DJ, Minor PD, Saldanha JA. A novel cytopathic microtitre plate assay for hepatitis A virus and anti-hepatitis A neutralizing antibodies. J Virol Methods. 1996; 59:147-154.
- Berlec A, Malovrh T, Zadravec P, Steyer A, Ravnikar M, Sabotic J y col. Expression of a hepatitis A antigen in *Lactococcus lactis* and *Escherichia coli* and evaluation of its immunogenicity. Appl Microbiol Biotechnol. 2013; 97:4333-4342.
- Boletín epidemiológico semanal IPK. Hepatitis viral tipo A: algunas consideraciones. BOLIPK.2008;18: 33.
- Bosch A, González Dankaart JF, Haro I, Gajardo R, Pérez JA, Pintó KM. A new continuous epitope of hepatitis A virus. J Med Virol.1998; 54:95-102.
- Bovier PA, Bock J, Ebengo TF, Frösner G, Glaus J, Herzog C, Loutan L. Predicted 30-year protection after vaccination with an aluminum-free virosomal hepatitis A vaccine. Predicted 30-year protection after vaccination with an aluminum-free virosomal hepatitis A vaccine. J Med Virol. 2010; 82:1629-1634.
- Brack K, Berk I, Magulski T, Lederer J, Dotzauer A, Vallbracht A. Hepatitis A virus inhibits cellular antiviral defense mechanisms induced by double-stranded RNA. J Virol. 2002; 76:11920-11930.
- Burritt JB, Bond CW, Doss KW, Jesaitis AJ. Filamentous phage display of oligopeptide libraries. Anal Biochem. 1996; 238:1-13.

- Burritt JB, Quinn MT, Jutila MA, Bond C, Jesaitis AJ. Topological mapping of neutrophil cytochrome b epitopes with phage-display libraries. J Biol Chem.1995; 270: 16974-16980.
- Caldini CP, Xander P, Kioshima ES, Lacerda AL, de Camargo ZP, Mariano M y col. Synthetic Peptides Mimic gp75 from *Paracoccidioides brasiliensis* in the Diagnosis of Paracoccidioidomycosis. Mycopathologia. 2012; 174: 1–10.
- Cao J, Meng S, Li C, Ji Y, Meng Q, Zhang Q y col. Efficient neutralization activity of cocktailed recombinant human antibodies against hepatitis A virus infection *in vitro* and *in vivo*. Journal of Medical Microbiology. 2008. 80:1171-1180.
- Cohen JI, Rosenblum B, Ticehurst JR, Daemer RJ, Feinstone SM, Purcell RH. Complete nucleotide sequence of an attenuated hepatitis A virus: comparison with wild-type virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987; 84, 2497–2501.
- Cohen L, Benichou D, Martin A. Analysis of deletion mutants indicates that the 2A polypeptide of hepatitis A virus participates in virion morphogenesis. J Virol. 2002; 76:7495-7505.
- Conference report. Hepatitis A and E: Update on prevention and epidemiology. Vaccine. 2010; 28:583-588.
- Costa AM, Amado LA, de Paula VS. Detection of replication defective hepatitis A virus based on the correlation between real-time polymerase chain reaction and ELISA in situ results. Mem Inst Oswaldo Cruz.2013;18:77-83.
- Chan HI, Yeh MK. Clinical development of liposome-based drugs: formulation, characterization, and therapeutic efficacy. Int J Nanomedicine. 2012; 7: 49–60.
- Chlibek R, von Sonnenburg F, Van Damme P, Smetana J, Tichy P, Gunapalaiah B y col. Antibody persistence and immune memory 4 years post-vaccination with combined hepatitis A and B vaccine in adults aged over 40 years. J Med Travel. 2011a; 18:145-148.
- Chlibek R, Smetana J, Bovstíková V, Splino M. Vaccination against viral hepatitis A and B in adults aged over 40 years-antibody persistence and immune memory. Epidemiol Mikrobiol Imunol. 2011b; 60:99-108.
- de la Cruz V, Lal A, McCutchan T. Immnogenecity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage. J Biol Chem.1988; 263: 4318-4322.
- De Paula VS, Amado LA, de Morais LM, de Lima SM, Tourhino RS, Gaspar AM y col. Kinetics of hepatitis A virus replication in vivo and in vitro using negative-strand quantitative PCR. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2009; 28:1167-1176.
- Deroo S, Muller CP. Antigenic and immunogenic phage displayed mimotopos as substitute antigens: applications and limitations. Combinatorial chemistry and high throughput screening. 2001; 4:75-110.
- Díaz BI, Sariol CA, Martínez R, Rodríguez L. Genomic Classification and Genetic Relationships of a New Variant of Hepatitis A Virus Isolated in Cuba. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1999; 94:361-363.
- Díaz BI, Sariol CA, Normann A, Rodríguez L, Flehmig B. Genetic relatedness of Cuban HAV wild-type isolates. J Med Virol. 2001;64:96-103.
- Dotzauer A, Heitmann A, Laue T, Kraemer L, Schwabe K, Paulmann D y col. The role of immunoglobulin A in prolonged and relapsing hepatitis A virus infections. J Gen Virol. 2012; 93:754-760.

- DotzauerA, Gebhardt U, Bieback K, Gottke U, Kracke A, Mages J y col. Hepatitis A virus-specific immunoglobulin A mediates infection of hepatocytes with hepatitis A virus via the asialoglycoprotein receptor. J Virol. 2000; 74:10950-10957.
- Dybward, A. Forre, O. Kjeldsen Kragh, J. Natvig, B. Soiud, M. Identification of new B cells epitopes in the sera of rheumatoid arthritis patients using a random nanopeptide phage library. Eur J Immunol. 1993; 23: 3189-3193.
- El Kasmi KC, Deroo S, Theisen D, Brons NHC, Deckmyn H, Muller CP. Crossreactivity of mimotopes and peptide homologues of a sequential epitope with a monoclonal antibody does not predict crossreactive immunogenicity. Vaccine. 1999;18:284-290.
- Emini EA, Hughes JV, Perlow DS, Boger J. Induction of hepatitis A virus-neutralizing antibody by a virus-specific synthetic peptide. J Virol. 1985; 55: 836-39.
- Feigelstock D, Thompson P, Mattoo P, Zhang Y, Kaplan GG. The human homolog of HAV(cr-1) codes for a hepatitis a virus cellular receptor. J Virol. 1998; 74:10950-10957.
- Felici F, Castagnoli L, Musacchio A, Jappelli R , Cesareni G. Selection of antibody ligands from a large library of oligopeptides expressed on a multivalent exposition vector. J Mol Biol. 1991;222:301-310.
- Felici F, Galfre G, Luzzago A, Monaci P, Nicosia A, Cortese R. Phage-displayed peptides as tools for characterization of human sera. Methods Enzymol. 1996; 267,116-129.
- Feng Z, Hensley L, McKnight KL, Hu F, Madden V, Ping L Fang y col. A pathogenic picornavirus acquires an envelope by hijacking cellular membranes. Nature. 2013; 4960:367-371.
- Fensterl V, Grotheer D, Berk I, Schlemminger S, Vallbracht A, Dotzauer A. Hepatitis A virus suppresses RIG-I-mediated IRF-3 activation to block induction of beta interferon. J Virol. 2005; 79:10968-10977.
- Field GB, Noble RL. Solid phase peptide synthesis utilizing 9-fluorenylmethoxycarbonyl amino acids. Int. J. Peptide Protein Res. 1990; 35: 161–214.
- Folgori A, Tafi R, Felici F, Galfre G, Cortese R, Monaci P y col. A general strategy to identify mimotopoes of patological antigens using only random peptides libraries and human sera. EMBO J.1994; 13: 2236-2243.
- Franco E, Meleleo C, Serino L, Sorbara D, Zaratti L. Epidemiology and prevention in developing countries. World J Hepatol. 2012; 4:68-73.
- Fujita Y, Taguchi H. Current status of multiple antigen-presenting peptide vaccine systems: Application of organic and inorganic nanoparticles. Chemistry Central Journal. 2011, 5:48. doi:10.1186/1752-153X-5-48.
- Gao J, Wang Y, Liu Z, Wang Z. Phage display and its application in vaccine design. Ann Microbiol.2010; 60:13-19.
- Garay H, Menéndez T, Cruz-Leal Yoelys, Coizeau E, Noda J, Morera V y col. Study of various presentation forms for a peptide mimetic of *Neisseria meningitides* serogroup B capsular polysaccharide. Bioconjugate Chem. 2011; 22:33-41.
- Gaubin M, Fanutti C, Mishal Z, Durrbach A, De Berardinis P, Sartorius R y col. Processing of filamentous phage virions in antigen-presenting cells targets both HLA class I and class II peptide loading compartments. DNA Cell Biol 2003; 22:11–18.
- Gauss-Müller V, Zhou MQ, von der Helm K, Deinhardt F. Recombinant proteins VP1 and VP3 of hepatitis A virus prime for neutralizing response. J Med Virol. 1990;31:277-283.

- Gavilondo J. Anticuerpos monoclonales. Editorial Elfos Scientiae. La Habana, Cuba 1995.
- Gazarian KG, Palacios-Rodríguez Y, Gazarian TG, Huerta L. HIV-1 V3 loop crown epitope-focused mimotope selection by patient serum from random phage display libraries: implications for the epitope structural features. Mol Immunol. 2013; 54:148-156.
- Geysen HM, Roda SJ, Mason TJ. A priori delineation of a peptide wich mimics a discontinuous antigen determinant. Mol Immunol. 1986;23: 709-715.
- Guide for the care and use of laboratory animal. EEC council Directive 86 / 609, OJL 358, 1, Dec. 12, 1987.
- Haq I, Chaudhry WN, Akhtar MN, Andleeb S, Qadri I. Bacteriophages and their implications on future biotechnology: a review. Virology J. 2012; 9:9. doi:10.1186/1743-422X-9-9.
- Harlow E, Lane D. Antibodies. A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory.1988.
- Haro I, Pérez S, García M, Chan W, Ercilla G. Liposome entrapment and immunogenic studies of a synthetic peptide bearing VP1 and VP3 domains of the hepatitis A virus: a robust method for vaccine design. FEBS Letters.2003;504:133-140.
- Haro I, Pintó RM, González-Dankaart JF, Pérez JA, Reig F, Bosch A. Anti-hepatitis A virus antibody response elicited in mice by different forms of a synthetic VP1 peptide. Microbiol. Immunol.1995;39:485-490.
- Hendrickx G, Van Herck K, Vorsters A, Wiersma S, Shapiro C, Andrus JK y col. Has the time come to control hepatitis A globally? Matching prevention to the changing epidemiology. J Viral Hepat. 2008; 15:1-15.
- Henry KA, Murira a, van Houten NE, Scott JK. Developing strategies to enhance and focus humoral immune responses using filamentous phage as a model antigen. Bioeng Bugs. 2011; 2: 275–283.
- Hollinger FB, Emerson SU. Hepatitis A virus. En: Knipe DM y Howley PM eds. Fields Virology. Fith edition. Vol. 1. New York: Lippincott Williams&Williams. 2007; 799-840.
- Hoogenboon HR, Griffiths AD, Johnson KS, Chiswell DJ, Hudson P, Winter G. Multi-subunit proteins on the surface of filamentous phage: methodologies for displaying antibody (Fab) heavy and light chains. Nucleic Acids Res. 1991; 19:4133–4137.
- Houimel M, Dellagi K. Peptide mimotopes of rabies virus glycoprotein with immunogenic activity. Vaccine 2009; 27:4648-4655
- Hughes JV, Stanton LW, Tomassini, JE, Long WJ, Scolnick EM. Neutralizing monoclonal antibodies to hepatitis A virus: partial localization of a neutralizing antigenic site. J Virol. 1984; 52: 465-473.
- Hughes JV, Stanton LW. Isolation and immunizations with hepatitis A viral structural proteins: induction of antiprotein, antiviral, and neutralizing responses. J Virol. 1985; 55: 395-401.
- Irshad I, Ansari MA, I K, L R. A Novel Single Step Multiplex Real Time Pcr Assay for Simultaneous Quantification of Hepatitis Virus A, B, C & E in Serum. J Gastroenterol Hepatol. 2013. 51:95-100.
- Irving M B, Pan O, Scott JK. Random-peptide libraries and antigen-fragment libraries for epitope mapping and the development of vaccines and diagnostics. Curr Opin Chem Biol. 2001; 5: 314-324.
- Jacobsen KH, Wiersma ST. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. Vaccine. 2010; 28: 6653-6657.

- Jespers LS, Messens JH, De Keyser A, Eeckhout D, Van dB I, Gansemans YG y col. Surface expression and ligand-based selection of cDNAs fused to filamentous phage gene VI. Biotechnology. 1995; 13: 378-382.
- Johnston JM, Harmon SA, Binn L, Richards OC, Ehrenfeld E, Summers DF. Antigenic and Immunogenic Properties of a Hepatitis A Virus Capsid Protein Expressed in *Escherichia coli*. J Infect Dis. 1988 ; 157: 1203-1211.
- Joyce JG, Hurni WM, Bogusky MJ, Garsky VM, Liang X, Citron MP y col. Enhancement of α-Helicity in the HIV-1 Inhibitory Peptide DP178 Leads to an Increased Affinity for human monoclonal antibody 2F5 but does not elicit neutralizing responses *in vitr.* J Biol Chem 2002; 277: 45811-45820.
- Kaplan G, Totsuka A, Thompson P, Akatsuka T, Moritsugu Y, Feinstone SM. Identification of a surface glycoprotein of African green monkey kidney cells as a receptor for hepatitis A virus. Embo J. 1996; 15:4282-4296.
- Kay B, Adey N, Manfredi J, Maratagnon A, Fowlkes D. An M13 phage library displaying random 38-amino-acid peptides as a source of novel sequences with affinity to selected targets. Gene.1993; 128: 59-65.
- Keller P, Arnold B, Shaw A, Tolman R, van Middlesworth F, Bondy S, Rusiecky V, Koeinig S, Zolla P, Emini E, Conley A. Identification of HIV vaccine candidate peptides by screening random phage epitope libraries. Virology. 1993; 193: 709-716.
- Kemp EH, Gavalas NG, Akhtar S, Krohn KJE, Carl Pallais C y col. Mapping of Human Autoantibody Binding Sites on the Calcium-Sensing Receptor. J Bone Miner Res. 2010; 25: 132–140.
- Konduru K, Nakamura SM, Kaplan GG. Hepatitis A virus (HAV) packing size limit. Virology J.2009; 6:204.doi:10.1186/1743-422x-6-204.
- Konduru K, Virata-Theimer ML, Yu MY, Kaplan GG. A simple and rapid hepatitis A virus (HAV) titration assay based on antibiotic resistance of infected cells: evaluation of the HAV neutralization potency of human immune globulin preparations. Virol J. 2008; 5:155. doi: 10.1186/1743-422X-5-155.
- Landford RE, Feng Z, Chavez D, Guerra B, Brasky K, Zhou Y y col. Acute hepatitis A virus infection is associated with a limited type I interferon response and existence of intrahepatic viral RNA. PNAS. 2011; 108:11223-11228.
- Lee JM, Lee HH, Hwang-Bo J, Shon DH, Kim W, Chung IS. Expression and immunogenicity of recombinant polypeptide VP1 of human hepatitis A virus in stably transformed fruitfly (*Drosophila melanogaster*) Schneider 2 cells. Biotechnology and Applied Biochemistry. 2009; 53:101–109.
- Lemon SM, Barclay W, Ferguson M, Murphy P, Jing L, Burke K y col. Immunogenicity and antigenicity of chimeric picornaviruses which express hepatitis A virus (HAV) peptide sequences: evidence for a neutralization domain near the amino terminus of VP1 of HAV. Virology. 1992a; 188: 285-295.
- Lemon SM, Binn L, Marchwicki RH. Radioimmunofocus assay for quantitation of hepatitis A virus in cell cultures. J Clin. Microbiol. 1983; 17: 834-839.
- Lemon SM, Binn LN. Serum neutralizing antibody response to hepatitis A virus. J. Infect.Dis. 1983; 148: 1033-39.
- Lemon SM, Jansen RW, Brown EA. Genetic, antigenic and biological differences between strains of hepatitis A virus. Vaccine. 1992b; 10: 40-44.
- Lemon SM, Murphy PC, Provost PJ, Chalikonda I, Davide JP, Schofield TL y col. Immunoprecipitation and virus neutralization assays demonstrate qualitative differences

between protective antibody responses to inactivated hepatitis A vaccine and passive immunization with immune globulin. J Infect Dis. 1997; 176: 9-19.

- Lemon SM, Murphy PC, Shields PA, Ping LH, Feinstone SM, Cromeans T y col. Antigenic and genetic variation in cytophatic virus variants arising durin persistent infection: evidence for genetic recombination. J Virol. 1991; 65:2056-2065.
- Lemon SM, Robertson BH. Current perspectives in virology and molecular biology of hepatitis a virus. Semin Virol. 1993; 4:285-295.
- Li RC, Li Y, Yi N, Huang L, Wan Z, Zhang Y y col. An open, prospective, randomized study comparing the immunogenicity and safety of two inactivated hepatitis a pediatric vaccines in toddlers, children and adolescents in china. Pediatr Infect Dis J. 2013a; 32:e77-81.
- Li H, Zhang XS, An J. Evaluation of the effect of immunization and safety of live attenuated and inactivated hepatitis A vaccine in China. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi. 2013b; 34:24-27.
- Linkins RW, Chonwattana W, Holtz TH, Wasinrapee P, Chaikummao S, Varangrat A y col. Hepatitis A and hepatitis B infection prevalence and associated risk factors in men who have sex with men, Bangkok, 2006–2008. J Med Virol. 2013; 85: 1499–1505.
- Liu J, Su Y, Dai C, Guo R. Expressing poliovirus (type I) and hepatitis A virus antigens by recombinant vaccinia virus. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 1996;18:209-213.
- Liu XE, Wushouer F, Gou A, Kuerban M, Li X, Sun Y y col. Comparison of immunogenicity between inactivated and live attenuated hepatitis A vaccines: A single-blind, randomized, parallel-group clinical trial among children in Xinjiang Uighur Autonomous region, China. Hum Vaccin Immunother. 2013; 9:7.
- López A, Rosabal Y, Hernández A, González B, Ríos J, Pérez M y col. Expresión of the Hepatitis A virus empty capsids in suspensión cells and transgenic tobacco plants (*Nicotiana tabacum L.*). Biotecnología Aplicada. 2008; 25: 42-46.
- Lugoboni F, Pajusco B, Albiero A, Quaglio G. Hepatitis A Virus among Drug Users and the Role of Vaccination: A Review. Front Psychiatry. 2012; 12:79.
- Luzzago, A. Felici, F. Tramontano, A. Pessi, A. Cortese, R. Mimicking of discontinuous epitopes by phage displayed peptide, I. Epitope mapping of human H ferritin using a phage library of constrained peptide. Gene.1993; 128: 51-57.
- Mahale SD, Pereira J, Natraj V, Iyer KS. Comparison of antibodies raised against the peptide 10-24 chicken riboflavin carrier protein (cRCP) by classical and multiple antigen peptides (MAP) approachs. J Immunol Methods 1996, 190:215-219.
- Marshall H, Nolan T, Díez Domingo J, Rombo L, Sokal EM, Marès J y col. Long-term (5-year) antibody persistence following two- and three-dose regimens of a combined hepatitis A and B vaccine in children aged 1-11 years. Vaccine. 2010; 28:4411-4415.
- Martin A, BenichouD, Chao SF, Cohen LM, Lemon SM. Maturation of the hepatitis A virus capsid protein VP1 in not dependent on proccesing by the 3Cpro proteinase. J Virol. 1999; 73:6220-6227.
- Martin A, Lemon SM. Hepatitis A virus: from discovery to vaccines. Hepatology. 2006; 43:164-172.
- Matsubara Teruhiko. Potential of Peptides as Inhibitors and Mimotopes: Selection of Carbohydrate-Mimetic Peptides from Phage Display Libraries. J Nucleic Acids. 2012. DOI. 10.1155/2012/740982.

- Mattioli S, Imberti L, Stellini R, Primi D. Mimicry of the immunodominant conformation-dependent antigenic site of hepatitis A virus by motifs selected from synthetic peptide libraries. J Virol. 1995;69:5294-5299.
- McLean GW, Owsianka AM, Subak-Sharpe JH, Marsden HS. Generation of anti-peptide presentation on immunogenicity. J Immunol Methods 1991, 137:149-152.
- Menéndez T, Santiago-Vispo N, Cruz-Leal Y , Coizeau E, Garay H, Reyes O y col. Identification and characterization of phage-displayed peptide mimetics of Neisseria meningitidis serogroup B capsular polysaccharide. Int J Med Microbiol. 2010; 301:16-25.
- Menéndez T. Fagos filamentosos como inmunógenos. En Elfos Scientiae (eds): Combinatoria molecular. 2004; 253-266.
- Meola A, Delmastro P, Monaci P, Luzzago A, Nicosia A, Felici F y col. Derivation of vaccines from mimotopes. Immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigens mimotopes displayed on filamentous phage. Vaccine. 1995; 15:1276.
- Muñoz M, Sospedra P, Gómara MJ, Mestres C, Haro I. The covalent coupling of HAV-VP3(110-121) synthetic peptide to liposomes: physicochemical studies. International Journal of Pharmaceutics.2004; 269.117-184.
- Nadala EC, Loh PC. Immunofluorescence and immunoperoxidase assays for the titration of infectious hepatitis A virus. J Virol Methods. 1990; 28: 117-124.
- Nainan OV, Brinton MA, Margolis HS. Identification of amino acids located in the antibody binding sites of human hepatitis A virus. Virology.1992; 19: 984-987.
- Neduva N, Linding R, Su-Angrand I, Stark A, de Masi F, Gibson TJ y col. Systematic discovery of new recognition peptides mimicking mediating protein interaction networks. PLos Biol. 2005; 3:e405.
- Niederhäuser S, Bruegger D, Zahno M, Vogt H, Peterhans E, Zanoni1 R, y col. A synthetic peptide encompassing the G5 antigenic region of the rabies virus induces high avidity but poorly neutralizing antibody. Vaccine 2008; 26:6749–6753.
- Nimmagadda SV, Avula SM, Biradhar N, Sula S, Lingala R, Chandran D y col. Development of recombinant single-chain variable fragment against hepatitis A virus and its use in quantification of hepatitis A antigen. Biologicals.2012; 40:299-308.
- Ochoa R. Técnicas inmunoenzimáticas en el desarrollo clínico de vacunas. Editorial Finlay. La Habana, Cuba. 2013.
- OMS. Declaración de Helsinki de la Asociación Médica Mundial. Principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos. 59ª Asamblea General. 2008. http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/17c_es.pdf, Seul, Corea.
- OMS. WHO position paper on hepatitis A vaccines. Wkly Epidemiol Rec. 2012; 87:261-276.
- Ott JJ, Irving G, Wiersma ST. Long-term protective effects of hepatitis A vaccines. A systemic review. Vaccine. 2012. 17; 31:3-11.
- Pande J, Szewczyk MM, Grover AK. Phage display: concept, innovations, applications and future. Biotechnol Adv. 2010; 28: 849-858.
- Paramasivan S, Shrivastava S, Kumar S. Synthesis of Highly Immunogenic Multiple Antigenic Peptides for Epitopes of Viral Antigen to Use in ELISA Int J Pept Res Ther 2009; 15:313–321.
- Park H, Lee YJ, Seong MW, Lee DH, Park MH, Song EY. Comparison of 3 automated immunoassays for detection of anti-hepatitis A virus immunoglobulin M in a tertiary care hospital. Ann Lab Med. 2013; 33:121-124.

- Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. Immunology and Cell Biology. 2004; 82: 488–496.
- Ping LH, Jansen RW, Stapleton JT, Cohen SI, Lemon SM. Identification of an inmunodominant antigenic site involving the capsid protein VP3 of hepatitis A virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1988; 85: 8281-85.
- Ping LH, Lemon SM. Antigenic structure of human hepatitis A virus defined by analysis of sacape mutants selected against murine monoclonal antibodies. J. Virol. 1992; 66: 2208-16.
- Pintó RM, González Dankaart JF, Sánchez G, Guix S, Gómara JM, García M, Haro I, Bosch A. Enhancement of the immunogenicity of a synthetic peptide bearing a VP3 epitope of hepatitis A virus.1998;438:106-110.
- Prezzi C, Nuzzo M, Meola A, Delmastro P, Glafre G, Cortese R y col. Selection of antigenic and inmunogenic mimics of hepetitis C virus using sera from patients. J Immunol. 1996;156: 4504-4513.
- Puccetti A. The role of peptide libraries in the identification of novel autoantigen targets in autoiimune diseases. Discovery medicine. 2010; 9:224-228.
- Qiu F, Zheng H, Yi Y, Jia Z, Cao J, Bi S. Comparative evaluation of a novel TaqMan real-time reverse transcription-polymerase chain reaction assay for hepatitis A virus detection. J Int Med Res. 2013; 41:427-434.
- Qu L, Feng Z, Yamane D, Liang Y, Lanford RE, Li K, Lemon SM. Disruption of TLR3 Signaling Due to Cleavage of TRIF by the Hepatitis A Virus Protease-Polymerase Processing Intermediate, 3CD. PLoS Pathog. 2011; 7: e1002169.
- Qu L, Lemon SM. Hepatitis A and hepatitis C viruses:divergent infection outcomes marked by similarities in induction and evasion of interferon responses. Seminars in liver disease.2010; 30:319-332.
- Quintana A, Sánchez L, Larralde O, Anderson D. Prevalence of Antibodies to Hepatitis E Virus in Residents of a District in Havana, Cuba. J Med Virol. 2005; 76:69–70.
- Rasched I y Oberer E. Ff coliphages: structural and functional relationships. Microbiol Rev.1986; 50: 401-427.
- Redondo N, Sanz MA, Steinberger J, Skern T, Kusov Y, Carrasco L. Translation directed by hepetitis A virus IRES in the absence of eIF4F complex and IF2. Plos One. 2012; 7:e52065.
- Reed LJ, Muench H. A simple method of estimating fifty percent endpoints. Am J Hyg. 1938; 27:493-497.
- Robertson BH, Jansen WR, Khanna B, Totsuka A, Nainan OV, Siegl G y col. Genetic relatedness of hepatitis A virus strains recovered from different geographical regions. J Gen Virol.1992; 73 :1365-1377.
- Rodríguez LA, González G, Bello M, Montalvo MC, Sariego S, Gutiérrez A. Vigilancia de las hepatitis virales: resultados de laboratorio. Cuba, 1992-2004. Rev Cubana Med Trop. 2006; 58:97-102.
- Rodríguez L, Quintana A, Montalvo MC, Lemos G, Bello M, Gutiérrez A y col. Dual Infection With Hepatitis A and E Viruses in Outbreaks and in Sporadic Clinical Cases: Cuba 1998–2003. J Med Virol. 2008; 80:798–802.
- Rosen E, Stapleton JT, Mcliden J. Synthesis of immunogenic hepatitis A virus particles by recombinant baculovirus. Vaccine. 1993;11:706-712.
- Saberifiroozi M. Hepatitis A virus infection: Is it an important hazard to public health? Hepat Mon. 2011; 11: 235–237.

- Sambrook J, Russel, DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 2001.
- Santiago Vispo N, Felici F, Castagnoli L, Cesareni G. Hybrid Rop-pIII proteins for the display of constrained peptides on filamentous phage capsids. Ann Biol Clin.1993;51: 917-922
- Schiavone M, Fiume G, Caivano A, de Laurentiis A, Falcone C, Masci Francesca F y col. Design and Characterization of a Peptide Mimotope of the HIV-1 gp120 Bridging Sheet. Int J Mol Sci .2012; 13:674-5699.
- Schofield DJ, Satterfiel W, Emerson SU, Purcell RH. Four chimpanzee monoclonal antibodies isolated by phage display neutralize hepatitis A virus. Virology. 2002; 292:127-36.
- Schulte I, Giugliano S, Timm J, Gold H, Heinemann FM, Khudyakov Y y col. Characterization of CD8+ T cell responses in acute and resolved hepatitis A virus infection. J Hepatol. 2011; 54:201-208.
- Silberstein E, Xing L, van de Beek W, Lu J, Chen H, Kaplan GG. Alteration of hepatitis A virus (HAV) particles by a soluble form of HAV cellular receptor 1 containing the immunoglobin-and mucin-like regions. J Virol. 2003; 77:8765-74.
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD y col. Measurement of protein using bicinchoninic acid. Anal Biochem.1985; 150:76-85.
- Stadler BM, Zürcher AW, Miescher S, Kricek F, Vogel M. Mimotope and anti-idiotypic vaccines to induce an anti-IgE response. Int Arch Allergy Immunol.1999; 118:119-121.
- Stapleton JT, Lange DK, LeDuc JW, Binn LN, Jansen RW, Lemon SM. The role of secretory immunity in hepatitis A virus infection. J Infect Dis. 1991; 163: 7-11.
- Stapleton JT, Lemon SM. Neutralization scape mutants define a dominant immunogenic neutralization site on hepatitis A virus. J Virol. 1987; 61: 491-98.
- Stapleton JT, Raina V, Winokur PL, Walters K, Klinzman D, Rosen E y col. Antigenic and immunogenic properties of recombinant hepatitis A virus 14S and 70S subviral particles. J Virol. 1993; 67: 1080-1085.
- Stapleton JT. Host immune response to hepatitis A virus. J Infect Dis. 1995; 171: 9-14.
- Su Q, Wen D, Yang Q, Zhang Y, Liu Ch, Wang L. Comparison of phage pVIII and KLH as vector in inducing the production of cytokines in C57BL/6J mice. Vaccine 2007; 25: 970–975.
- Tam JP. Synthesis and applications of branched peptides in immunological methods and vaccines. En Gutte B (eds). Peptides: Synthesis structures and applications. 1st edition. New York: Academic Press. 1995: 455-500.
- Thompson JD, Higgins DG, and Gibson TJ. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 1994; 22:4673-4680.
- Van Damme P, Kafeja F, Van Der Wielen M, Leyssen M, Jacquet JM. Long-term immunogenicity and immune memory after two doses of the adult formulation of a combined hepatitis A and B vaccine in children 1 to 11 years of age. Pediatr Inf Dis. 2011; 30:703-705.
- Van Herck K, Crasta PD, Messier M, Hardt K, Van Damme P. Seventeen-year antibody persistence in adults primed with two doses of an inactivated hepatitis A vaccine. Hum Vaccin Immunother. 2012; 8:323-327.

- Van Herck K, Jacquet JM, Van Damme P. Antibody persistence and immune memory in healthy adults following vaccination with a two-dose inactivated hepatitis A vaccine: long-term follow-up at 15 years. J Med Virol. 2011; 83:1885-1891.
- van Houten NE, Henry KA, Smith GP, Scott JK. Engineering filamentous phage carriers to improve focusing of antibody responses against peptides. Vaccine. 2010; 28:2174-2185.
- van Houten NE, Zwick MB, Menendez A, Scott JK. Filamentous phage as an immunogenic carrier to elicit focused antibody responses against a synthetic peptide. Vaccine 2006; 24:4188–4200.
- Van Regenmortel MVH. Antigenicity and immunogenicity synthetic peptides. Biologicals. 2001; 29:209-213.
- Vincent LM. Absence of amplification role of the protein KLH on antibody response generated by a MAP Staphyloccocus aureus enterotoxin A (SEA) peptide comparing with the corresponding monomeric peptide. J Immunol Methods. 2011; 365:110-117.
- Wang LF, Yu M. Epitope identification and discovery using phage display libraries: applications in vaccine development and diagnostics. Current drug targets. 2004;5:1-15.
- Wang XN, Zhang GP, Zhou JY, Feng CH, Ynag YY, Li QM y col. Identification of neutralizing epitopes on the VP2 protein of infectious bursal disease virus by phage-displayed heptapeptide library screening and synthetic peptide mapping. Viral Immunol. 2005;18:549-57
- Wasley A, Fiore A, Bell BP. Hepatitis A in the era of vaccination. Epidemiol Rev.2006; 28:101-111.
- Wilkinson RA, Evans RR, Jacobs JM, Slunaker D, Pincus SH, Pinter A y col. Peptides selected from a phage display library with an HIV-Neutralizing antibody elicit antibodies to HIV gp120 in rabbits, but not to the same epitope. Aids research and human retroviruses. 2007; 23:1416–1427.
- Yang L, Cen J, Xue Q, Li J, Bi Y, Sun L y col. Identification of rabies virus mimotopes screened from a phage display peptide library with purified dog anti-rabies virus serum IgG. Virus Res.2013; 174:47-51.
- Yang Y, Liang Y, Qu L, Chen Z, Yi M, Li K y col. Disruption of innate immunity due to mitochondrial targeting of a picornaviral protease precursor. Proc Natl Acad Sci USA. 2007; 104:7253-7258.
- Yano A, Onozuka A, Asaki-Ozaki Y, Imai S, Hanada N, Miwa Y y col. An ingenious design for peptides vaccines. Vaccine. 2005; 23: 2322-2326.
- Zamit AL, Ostrowski M, Fondevila N, Wigdorovitz A, Romera A, Bratanich AC. Use of phage displayed peptide libraries for epitope mappimg of Bovine viral diarrhea virus E2 protein. Res J Immunol. 2009; 3:31-36.
- Zhang F, Lu YJ, Malley R. Multiple antigen-presenting system (MAPS) to induce comprehensive B- and T-cell immunity. PNAS. 2013; 110:13564-13569.
- Zhao G**,** Lin Y**,** Du L**,** Guan J**,** Sun S**,** Sui H y col. An M2e-based multiple antigenic peptide vaccine protects mice from lethal challenge with divergent H5N1 influenza viruses. Virology J 2010; 7**:**9. doi:10.1186/1743-422X-7-9.
- Zhong Y, Cai J, Zhang C, Xing X, Qin E, He J y col. Mimotopes selected with neutralizing antibodies against multiple subtypes of influenza A. Virology J. 2011; 8:542. doi:10.1186/1743-422X-8-542.

- Zhou Y, Callendret B, Xu D, Brasky KM, Feng Z, Hensley LL y col. Dominance of the CD4+ T helper cell response during acute resolving hepatitis A virus infection. JEM. 2012; 2009:1481-1492.

IX. ANEXOS.

ACTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO. GRUPO A.

Instituto Finlay. Centro de Producción e Investigación de Vacunas y Sueros.Ciudad de la Habana. Cuba.

TITULO DEL ESTUDIO:

Obtención de sueros y ADN linfocitario de individuos con anticuerpos contra el virus de la hepatitis A adquiridos por vía natural y post-vacunación.

INFORMACION DEL INVESTIGADOR :

Yo _____, he sido requerido para participar en este estudio clínico bajo la dirección del Dr._____

y la supervisión del Dr. _____. Otros profesionales que trabajan con ellos como miembros de su equipo, me pueden ayudar o actuar por ellos. Seré uno de los 50 voluntarios a participar en este estudio.

OBJETIVOS:

Obtener muestras de sangre para ser empleadas en la investigación y desarrollo de una vacuna contra la hepatitis A.

PROCEDIMIENTOS:

Me explicaron que perteneceré a los voluntarios del grupo A, a los cuales solamente se les realizarán dos extracciones de sangre, mediando un tiempo de un mes entre cada extracción.

A las muestras de sangre se les realizarán pruebas de laboratorio para determinar:

a) Si presentan o han presentado infección por el virus de la hepatitis A.
b) Si presentan infección por los virus de la hepatitis B y C y el VIH.

Las muestras no serán empleadas con otros objetivos que no sean los señalados en este estudio.

Para ser aceptado en el estudio, seré sometido a examen físico e interrogatorio médico.

EXCLUSIONES:

No podría participar en el estudio si alguna de las siguientes condiciones fuera aplicable en mi caso:

- Sufrir de inmunodeficiencia innata ó adquirida.
- Por decisión expresa del equipo de investigación.

POSIBLES RIESGOS / INCOMODIDADES:

Conozco que el riesgo durante este estudio es muy bajo. Las extracciones de sangre serán ejecutadas por personal calificado y empleando material estéril desechable. Además, la cantidad de sangre extraída será la mínima requerida (5 a 20 ml) en todos los casos.

BENEFICIOS:

Estoy enterado de que recibiré como beneficio por mi inclusión en este estudio el chequeo de mi estado de salud por la evaluación clínica y de laboratorio. Mi participación será muy apreciada y ayudará al desarrollo de una vacuna contra la hepatitis A.

CONFIDENCIALIDAD:

Comprendo que toda la información relacionada con mi persona que se genere durante el estudio será conservada adecuadamente y tendrá un carácter confidencial, así mismo al firmar este documento autorizo a los representantes de las instituciones involucradas en el estudio a revisar esta información, la que solo usarán con fines investigativos, y podrán publicar sin revelar mi identidad, utilizando un código para ello.

Mi identidad no podrá ser revelada a menos que esto sea solicitado por la ley.

Si presentara infección por los virus de la hepatitis B y C o el VIH, se le comunicará exclusivamente al sistema de Salud Pública para que proceda como está estipulado en la legislación vigente para el diagnóstico confirmatorio, control y tratamiento de dichas enfermedades infecciosas.

Tendré el derecho de que se me comuniquen los resultados de las pruebas realizadas, solicitándolos al equipo de investigación que realizó el estudio.

COMPENSACIÓN EN CASO DE DAÑO:

De acuerdo al análisis individual de cada caso.

DERECHO A NEGARSE O ABANDONAR:

Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo negarme a participar, o retirarme del ensayo en cualquier momento sin represión de ninguna índole. Entiendo también que el investigador tiene el derecho a retirarme del estudio en cualquier momento.

PREGUNTAS Y RESPUESTAS:

El Dr. _____me ha explicado todos los detalles de este estudio y los he comprendido, todas mis preguntas fueron respondidas. Si tengo alguna otra pregunta acerca del estudio puedo dirigirme a _____ en _____
Si tengo alguna pregunta relacionada con mis derechos como voluntario, o sufro algún daño a consecuencia del estudio puedo dirigirme a _____ _____ (responsable del estudio y/o al equipo de investigación) en _____.

TITULO DEL ESTUDIO:

Obtención de sueros y ADN linfocitario de pacientes convalecientes de hepatitis A y de individuos vacunados.

CONSENTIMIENTO

He leído la información que se me proporcionó en este documento, considero que he tenido suficiente tiempo para tomar mi decisión y estoy voluntariamente de acuerdo con participar en este estudio. Después de firmar el consentimiento informado recibiré una copia del mismo.

_____ _____
Nombre y apellidos del voluntario Carne de identidad No.

_____ _____
Firma del voluntario Fecha

_____ _____ _____
Nombre y apellidos del testigo Firma Fecha

_____ _____ _____
Nombre y apellidos del Investigador Firma Fecha

ACTA DE CONSENTIMIENTO INFORMADO. GRUPO B.

Instituto Finlay. Centro de Producción e Investigación de Vacunas y Sueros.Ciudad de la Habana. Cuba.

TITULO DEL ESTUDIO:

Obtención de sueros y ADN linfocitario de individuos con anticuerpos contra el virus de la hepatitis A adquiridos por vía natural y post-vacunación.

INFORMACION DEL INVESTIGADOR :

Yo _____, he sido requerido para participar en este estudio clínico bajo la dirección del Dr._____
y la supervisión del Dr. _____. Otros profesionales que trabajan con ellos como miembros de su equipo, me pueden ayudar o actuar por ellos. Seré uno de los 200 voluntarios a participar en este estudio.

OBJETIVOS:

Obtener muestras de sangre para ser empleadas en la investigación y desarrollo de una vacuna contra la hepatitis A.

PROCEDIMIENTOS:

Me explicaron que perteneceré a los voluntarios del grupo B, los cuales participarán durante aproximadamente 8 meses en el estudio. Se les practicarán tres extracciones de sangre, la primera al principio y las dos restantes al mes y 8 meses de iniciado el estudio. A este grupo además, se le aplicará una vacuna contra la hepatitis A en dos dosis, al mes y a los 7 meses de comenzada la investigación.
La siguiente tabla facilitará la comprensión de la participación que tendrán los voluntarios en cada etapa.

	1er día	1er mes	7mo mes	8vo mes
Grupo B	1ra Extracción de sangre	2da Extracción 1ra Dosis vacuna	2da Dosis vacuna	3ra Extracción de sangre

A las muestras de sangre se les realizarán pruebas de laboratorio para determinar:

a) Si presentan o han presentado infección por el virus de la hepatitis A.
b) Si presentan infección por los virus de la hepatitis B y C y el VIH.

Las muestras no serán empleadas con otros objetivos que no sean los señalados en este estudio.
Para ser aceptado en el estudio, seré sometido a examen físico e interrogatorio médico.

EXCLUSIONES:

No podría participar en el estudio si alguna de las siguientes condiciones fuera aplicable en mi caso:

- Sufrir de inmunodeficiencia innata ó adquirida.
- Haber sufrido reacciones adversas severas frente a vacunaciones previas.
- Por decisión expresa del equipo de investigación.

POSIBLES RIESGOS / INCOMODIDADES:

Conozco que el riesgo durante este estudio es muy bajo. Las extracciones de sangre y las vacunaciones serán ejecutadas por personal calificado y empleando material estéril desechable. La cantidad de sangre extraída será la mínima requerida (5 a 20 ml) en todos los casos. Se dispondrá del transporte y medidas de primeros auxilios (adrenalina) por si ocurriese alguna reacción alérgica en alguno de los vacunados.

Los voluntarios del grupo B, recibirán una vacuna comercial contra la hepatitis A. Este producto se conoce con el nombre comercial de Havrix, y es producido y comercializado por la compañía SmithKline Beecham,

Las reacciones que puede producir esta vacuna son de carácter leve/moderado y tienen una duración de 24 a 48 horas. En el sitio de la inyección puede producirse dolor, hinchazón y enrojecimiento en el 10% de los vacunados. También se puede presentar fiebre, malestar y falta de apetito en menos del 10% de los mismos.

Se dispondrá de transporte y primeros auxilios por si ocurriese reacción alérgica en los vacunados.

BENEFICIOS:

Estoy enterado de que recibiré como beneficio por mi inclusión en este estudio el chequeo de mi estado de salud por la evaluación clínica y de laboratorio. Recibiré el beneficio adicional de ser inmunizado contra la hepatitis A, con una vacuna segura y eficaz que ha sido licenciada y está aprobada para su uso comercial. Mi participación será muy apreciada y ayudará al desarrollo de una vacuna contra la hepatitis A.

CONFIDENCIALIDAD:

Comprendo que toda la información relacionada con mi persona que se genere durante el estudio será conservada adecuadamente y tendrá un carácter confidencial, así mismo al firmar este documento autorizo a los representantes de las instituciones involucradas en el estudio a revisar esta información, la que solo usarán con fines investigativos, y podrán publicar sin revelar mi identidad, utilizando un código para ello.

Mi identidad no podrá ser revelada a menos que esto sea solicitado por la ley.

Si presentara infección por los virus de la hepatitis B y C o el VIH, se le comunicará exclusivamente al sistema de Salud Pública para que proceda como está estipulado en la legislación vigente para el diagnóstico confirmatorio, control y tratamiento de dichas enfermedades infecciosas.

Tendré el derecho de que se me comuniquen los resultados de las pruebas realizadas, solicitándolos al equipo de investigación que realizó el estudio.

COMPENSACIÓN EN CASO DE DAÑO:

De acuerdo al análisis individual de cada caso.

DERECHO A NEGARSE O ABANDONAR:

Comprendo que mi participación es voluntaria y que puedo negarme a participar, o retirarme del ensayo en cualquier momento sin represión de ninguna índole. Entiendo también que el investigador tiene el derecho a retirarme del estudio en cualquier momento.

PREGUNTAS Y RESPUESTAS:

El Dr. _____me ha explicado todos los detalles de este estudio y los he comprendido, todas mis preguntas fueron respondidas. Si tengo alguna otra pregunta acerca del estudio puedo dirigirme a _____ en _____

Si tengo alguna pregunta relacionada con mis derechos como voluntario, o sufro algún daño a consecuencia del estudio puedo dirigirme a _____ _____ (responsable del estudio y/o al equipo de investigación) en _____.

TITULO DEL ESTUDIO:

Obtención de sueros y ADN linfocitario de pacientes convalecientes de hepatitis A y de individuos vacunados.

CONSENTIMIENTO

He leído la información que se me proporcionó en este documento, considero que he tenido suficiente tiempo para tomar mi decisión y estoy voluntariamente de acuerdo con participar en este estudio. Después de firmar el consentimiento informado recibiré una copia del mismo.

_____	_____
Nombre y apellidos del voluntario	Carne de identidad No.
_____	_____
Firma del voluntario	Fecha

_____	_____	_____
Nombre y apellidos del testigo	Firma	Fecha
_____	_____	_____
Nombre y apellidos del Investigador	Firma	Fecha

INSTITUTO FINLAY
Centro de Investigación-Producción de Vacunas y Sueros

Comité de Bioética

A: Dra. Concepción Campa Huergo
Presidenta-Directora General
Instituto Finlay.

c.c. Dr. Gustavo Sierra González
Vicerpesidente de Investigaciones
Instituto Finlay

Dra. Cc. Ela María Pérez Hernández
Jefa de Proyecto

Lic. Osmany Larralde
Investigador Responsable de Estudio.

DE: Noel González Gotera
Coordinador
Comité de Bioética del Instituto Finlay

REF: **Dictamen del Comité de Bioética sobre el protocolo de estudio *"Obtención de suero y ADN linfocitario de individuos con anticuerpos contra el virus de la hepatitis A adquiridos por vía natural y post-vacunación"*.**

Dictamen 01/2000

INTRODUCCIÓN

El Comité de Bioética del Instituto Finlay (en lo adelante el Comité), creado mediante la Resolución No. 39 / 96 del 30 de agosto de 1996, por la Presidenta Directora-General de esa institución, Dra. Concepción Campa Huergo, atendió la solicitud de revisión del protocolo del estudio ***"Obtención de suero y ADN linfocitario de individuos con anticuerpos contra el virus de la hepatitis A adquiridos por vía natural y post-vacunación"*** (en lo adelante el Estudio), presentado a este Comité por el Dr. Gustavo Sierra González, Vicepresidente de Investigaciones del Instituto Finlay, en comunicación fechada del 30 de mayo del 2000 y avalada por la Dra. Concepción Campa Huergo, Presidenta-Directora General del Instituto Finlay, en comunicación del pasado 5 de junio del 2000.

El Comité dió inicio al proceso de revisión general del Estudio en su reunión ordinaria del 21 de junio del 2000, a la cual fueron invitados la Dra. Cc. Ela María Pérez Hernández, Jefa del Proyecto, y Osmany Larralde, Investigador Responsable del Estudio. En esta reunión el Comité tuvo un profundo y amplio intercambio sobre el Estudio con ambos especialistas, durante el cual le fueron hechas a éste un conjunto de observaciones referentes al tratamiento de los aspectos éticos implicados en el mismo.

Ambos especialistas, de forma muy receptiva, estuvieron de acuerdo con las mismas, tomaron nota de todas ellas y, con posterioridad, remitieron al Comité una nueva versión electrónica del Estudio, con las debidas correcciones, a partir de las observaciones hechas en la citada reunión del 21 de junio del 2000.

El Comité, en reunión ordinaria del pasado 17 de julio, revisó la nueva versión corregida y analizó un conjunto de aspectos de procedimiento y contenido relacionados con el Estudio, y recomendó, finalmente, un conjunto de modificaciones menores al texto del Protocolo de Estudio, tras lo cual desea expresar:

1) su conformidad con el tratamiento de los aspectos ético-investigativos abordados en el cuerpo de la mencionada versión final del Protocolo Estudio ***"Obtención de suero y ADN linfocitario de individuos con anticuerpos contra el virus de la hepatitis A adquiridos por vía natural y post-vacunación"***, cuya versión definitiva se adjunta al presente Dictamen 01/2000.

Finalmente, deseamos expresar nuestro reconocimiento a la Dra. Cc. Ela María Pérez Hernández y al Lic. Osmany Larralde por la colaboración brindada a este Comité durante el proceso de revisión del Protocolo del Estudio, así como por las modificaciones que, a sugerencias de éste, realizaron al mismo durante las diferentes etapas de su proceso de revisión.

Dado en Ciudad de La Habana, a los 3 días del mes de agosto del 2000. "AÑO DEL 40 ANIVERSARIO DE LA DECISIÓN DE PATRIA O MUERTE".

Por el Comité de Bioética del Instituto Finlay:

Lic. Beatriz Agüero López

Dra. Amanda Moreira Aquino

Lic. Margarita Hernández Carbonero

Lic. Margarita Rodríguez Delgado

Noel González Gotera (Coordinador)

Lic. Gilberto Sotolongo Aguilar

Ing. José Suárez Rivero

X. PRODUCCIÓN CIENTÍFICA DEL AUTOR

Publicaciones de la tesis

Larralde O, Martínez R, Camacho F, Amin N, **Aguilar A** y col. Identification of hepatitis A virus mimotopes by phage display, antigenicity and immunogenicity. J Virol Meth.2007;140:49-58.

Aguilar A, Martínez R, Camacho F y col. Ensayo de neutralización *in vitro* de aplicación en la evaluación de inmunógenos contra la hepatitis A, obtenidos mediante la tecnología de expresión en fagos filamentosos. Vaccimonitor. 2010; 19(1):16-19.

Aguilar A, Camacho F, Amin N y col. Comparación de la antigenicidad de dos construcciones peptídicas de mimotopos del virus de la hepatitis A empleando suero de ratones inmunizados. Vaccimonitor. 2013; 22(3):43-46

Aguilar A, Camacho F, Martínez R y col. Study of peptide mimetics of Hepatitis A virus conjugated to Keyhole limpet hemocyanin and as Multiple antigen peptide system. Int Pep Res Ther . 2014; 20 (1): 33-42.

Publicaciones relacionadas con el tema:

N Amin, **A Aguilar**, F Camacho y col. Identification of dengue-specific B-cell epitopes by phage display random peptide library. Malaysian Journal of Medical Sciences. 2009; 16(4):4-14.

Camacho F, Puchades Y, **Aguilar A** y col. Cromatografía de exclusión molecular como metodología para la purificación de bacteriófagos. Vaccimonitor. 2012; 2012; 21 (2):6-10.

Presentaciones en eventos:

Congreso de Farmacia. 2005. Cuba. Identificación de mimotopos del VHA mediante la expresión en fagos. **Aguilar A**.

V Congreso de la sociedad cubana de Inmunología.2006. Cuba. Evaluación de la capacidad neutralizante de mimotopos del virus de la hepatitis A obtenidos mediante la tecnología de expresión en fagos recombinantes. **Aguilar A.**

Hepatología 2006. Cuba. Evaluación por ELISA de la respuesta de anticuerpos contra péptidos sintéticos mimotopes del virus de la hepatitis A. **Aguilar A.**

VI Congreso Nacional de inmunología. 2008. Cuba. Evaluación de inmunogenicidad en ratones de péptidos sintéticos mimotopes del virus de la hepatitis A. **Aguilar A.**

Vaccipharma 2009. Cuba. *In vitro* neutralization assay to evaluate new vaccine candidates. **Aguilar A**.

EMBO World Lecture course: Virus-Host partners in pathogenecity. 2010. Costa Rica. Identification of hepatitis A virus neutralizing mimotopes by phage-displayed peptide libraries. **Aguilar A**.

Vaccipharma 2012. Cuba. Immunogenicity of hepatitis A virus mimotopes identified from a phage display peptide library presented to the immune system as Keyhole limpet hemocyanin conjugated peptides and multiple antigen peptide system. **Aguilar A**.