

**Centro de Ingeniería Genética y
Biotecnología División de Vacunas**

**Particulación de variantes recombinantes de la proteína de la
cápsida del virus de la hepatitis C y su caracterización**

*Tesis en opción al grado científico de Doctor en Ciencias
Biológicas*

Autor: Lic. Nelson Acosta Rivero

Tutor: Dr. Juan Morales Grillo

Ciudad de La Habana
2003

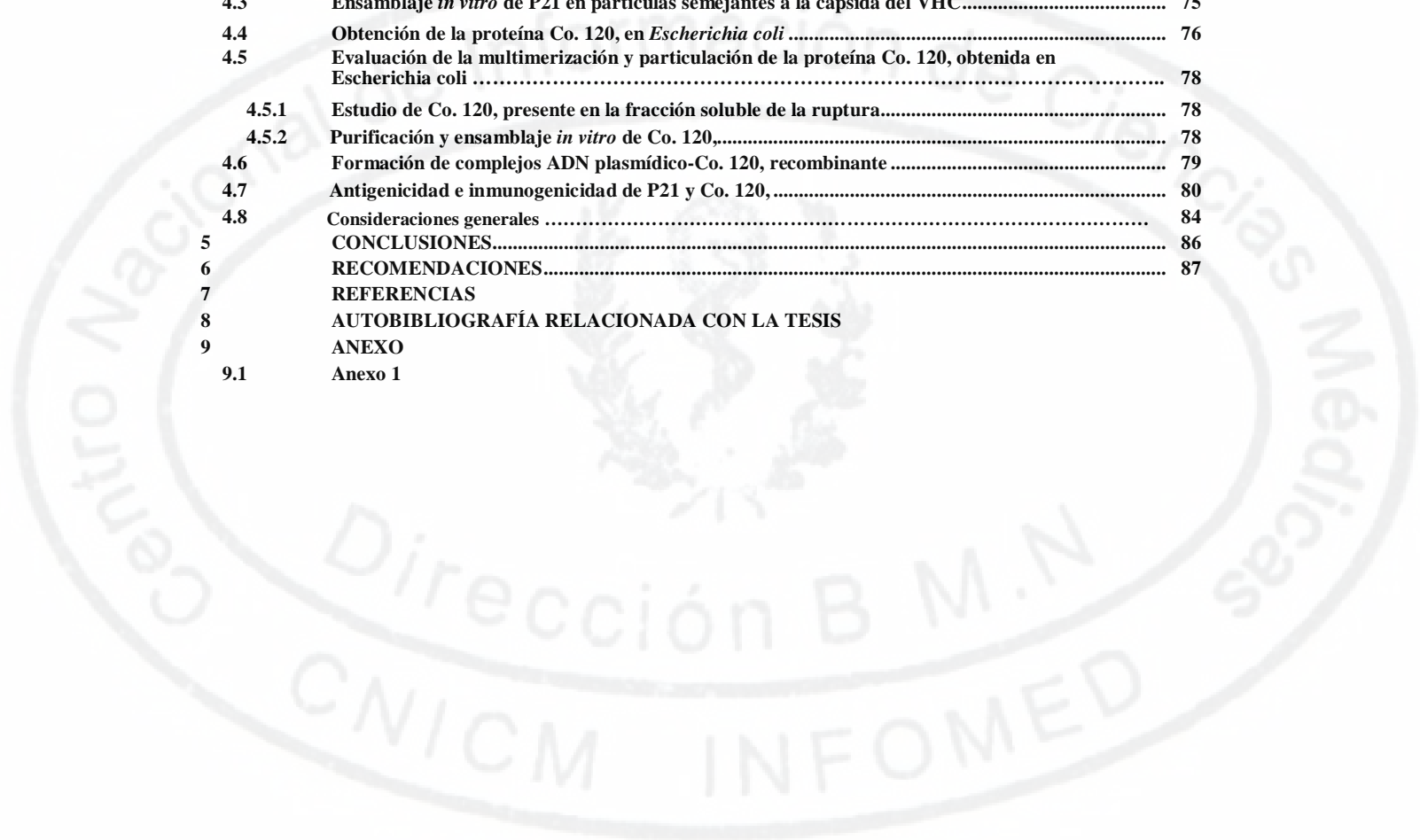
LISTA DE CONTENIDO

1	INTRODUCCIÓN	1
2	REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	2
1.1	Antecedentes históricos del virus de la hepatitis C (VHC)	2
1.2	Características generales del VHC. Biología molecular del virus	2
1.3	Heterogeneidad del VHC y evasión de la respuesta inmune.....	5
1.4	Epidemiología.....	6
1.5	Respuesta inmune	7
1.5.1	Respuesta de anticuerpos	8
1.5.2	Respuesta de linfocitos T CD4+	9
1.5.3	Respuesta de linfocitos T CD8+	9
1.5.4	Influencia de los haplotipos HLA y la variación de los epitopos en la respuesta inmune celular contra el virus de la Hepatitis C.....	10
1.6	Inmunopatogénesis y hepatocarcinogénesis.....	11
1.7	Estrategias terapéuticas y profilácticas.....	11
1.8	La proteína de la cápsida (HCcAg)	13
1.8.1	Biosíntesis y propiedades bioquímicas	13
1.8.2	Localización celular y función.....	13
1.8.3	Ensamblaje y replicación	14
1.8.4	Propiedades Inmunológicas	15
1.9	Expresión de proteínas heterólogas en <i>Escherichia coli</i> y en <i>Pichia pastoris</i>	16
1.10	Expresión de proteínas virales ensambladas en partículas semejantes a virus (PSV).....	17
1.10.1	Propiedades inmunológicas de las PSV	19
2	MATERIALES Y METODOS.....	20
2.1	Plasmidios y aislamiento viral utilizados.....	20
2.2	Microorganismos, células de organismos superiores y virus recombinante empleados	22
2.3	Medios de cultivo, enzimas y reactivos	23
2.3.1	Medios de cultivo	23
2.3.2	Enzimas	24
2.3.3	Reactivos y conjugados.....	24
2.4	Condiciones de crecimiento de la cepa DH5a	24
2.5	Péptidos y proteínas	24
2.6	Oligonucleótidos sintéticos	25
2.7	Anticuerpos	26
2.8	Métodos de biología molecular	26
2.8.1	Técnicas generales de biología molecular	26
2.8.2	Transformación de bacterias y levaduras	26
2.8.3	Aislamiento de ADN	27
2.8.4	Métodos de hibridación	27
2.8.5	Secuencia nucleotídica	27
2.8.6	Amplificación de ADN <i>in vitro</i> mediante la reacción en cadena de la polimerasa (RCP).....	27
2.9	Obtención de la proteína HCcAg en <i>P. pastoris</i>	28
2.9.1	Construcción del plasmidio pNAO.CoEL340 para la expresión de HCcAg en <i>P. pastoris</i>	28
2.10	Transformación en <i>P. pastoris</i> y análisis de los transformantes	28
2.11	Condiciones de cultivo de las cepas de <i>P. pastoris</i> en el fermentador.....	29
2.12	Condiciones de ruptura de <i>P. pastoris</i>	30
2.13	Purificación de la proteína HCcAg derivada de <i>P. pastoris</i>	31
2.13.1	Condiciones de ruptura de <i>P. pastoris</i> en homogenizador celular.....	31
2.13.2	Semipurificación de la proteína HCcAg derivada de <i>P. pastoris</i>	31
2.13.3	Purificación de la proteína HCcAg derivada de <i>P. pastoris</i> por electroelución	32
2.13.4	Purificación de la proteína HCcAg derivada de <i>P. pastoris</i> por cromatografía de intercambio iónico	32
2.13.5	Análisis por ultrafiltración de la proteína HCcAg derivada de <i>P. pastoris</i>	32
2.13.6	Análisis por gradientes isopícnicos de sacarosa de la proteína HCcAg derivada de <i>P. pastoris</i> . Determinación de la densidad de flotación (ρ).....	33
2.13.7	Análisis de la proteína HCcAg derivada de <i>P. pastoris</i> por cromatografía de exclusión molecular	33
2.14	Obtención de la proteína HCcAg truncada (Co. 120 _e) en <i>E. coli</i>	34

Lista de contenido

2.14.1	Construcción del plasmidio pSLCo120 para la obtención de Co. 120 _e en <i>E. coli</i>	34
2.15	Condiciones de cultivo de las cepas de <i>E. coli</i>	34
2.15.1	Condiciones de cultivo en zaranda de la cepa de <i>E. coli</i> transformada con el plasmidio pSLCo.120	34
2.16	Purificación de la proteína Co. 120 _e derivada de <i>E. coli</i>	34
2.17	Caracterización de los complejos de ADN plasmídico-Co. 120 _e	35
2.17.1	Preparación de mezclas ADN plasmídico-Co. 120 _e y su caracterización	35
2.18	Esquemas de inmunización	35
2.18.1	Inmunización de ratones con las variantes de la proteína HCcAg derivadas de <i>P. pastoris</i> y de <i>E. coli</i>	35
2.18.2	Inmunización de ratones con la proteína Co.120 _e derivada de <i>E. coli</i> para evaluar respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH)	36
2.18.3	Inmunización de ratones con la proteína Co.120 _e derivada de <i>E. coli</i> en combinación con diferentes adyuvantes	36
2.19	Métodos analíticos	36
2.19.1	Determinación de la concentración de proteínas	36
2.19.2	Microscopía electrónica de transmisión (ME)	37
2.19.3	Formación de inmunocomplejos (IME)	37
2.19.4	Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE	38
2.19.5	Tinción con azul Coomassie R-250	38
2.19.6	Inmunodetección mediante "immunoblot (<i>western blot</i>) - immunodot" (<i>dot blot</i>)	38
2.19.7	Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA)	38
2.19.8	Ensayo de proliferación linfocitaria	39
2.19.9	Ensayo de hipersensibilidad retardada (DTH)	40
2.20	Reto con virus vaccinia recombinante	40
2.20.1	Titulación de virus Vaccinia a partir de los ovarios extraídos de los ratones	40
2.21	Análisis estadísticos	41
3	RESULTADOS	42
3.1	Obtención de la proteína HCcAg en la levadura <i>P. pastoris</i>	42
3.1.1	Clonación del gen codificante para la proteína HCcAg	42
3.1.2	Obtención de cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i>	42
3.1.3	Síntesis de la proteína HCcAg en <i>P. pastoris</i>	43
3.1.4	Procesamiento de la proteína HCcAg producida en <i>P. pastoris</i>	44
3.1.5	Caracterización de la proteína HCcAg obtenida en la fracción soluble de la ruptura de <i>P. pastoris</i>	46
3.1.5.1	Caracterización de la proteína HCcAg recombinante por centrifugación en gradientes isopícnicos de sacarosa	47
3.1.5.2	Caracterización de la proteína HCcAg recombinante por cromatografía de exclusión molecular	49
3.1.5.3	Caracterización de la proteína HCcAg recombinante en las fracciones del gradiente de sacarosa por ME e IME	49
3.1.6	Semi-purificación de la proteína HCcAg (P21) extraída de la fracción insoluble de la ruptura celular	50
3.1.7	Purificación de P21	51
3.1.8	Caracterización de la proteína P21 purificada	52
3.1.8.1	Solubilización de la proteína P21 purificada	52
3.1.8.2	Caracterización del ensamblaje de P21 <i>in vitro</i>	53
3.1.8.3	Estudios de ultrafiltración	53
3.1.8.4	Caracterización de P21 por centrifugación en gradientes isopícnicos de sacarosa	53
3.1.8.5	Caracterización de P21 por cromatografía de exclusión molecular	54
3.1.8.6	Caracterización de P21 por ME	55
3.2	Obtención de la proteína HCcAg truncada (Co.120 _c) en <i>E. coli</i>	55
3.2.1.1	Clonación del gen codificante para Co.120 _c	55
3.2.2	Síntesis y semipurificación de Co.120 _c en <i>E. coli</i>	56
3.2.3	Caracterización de la proteína Co. 120 _c obtenida en la fracción soluble	57
3.2.3.1	Caracterización de Co. 120 _c mediante IME	57
3.2.3.2	Caracterización de Co. 120 _c mediante centrifugación en gradientes de sacarosa	58
3.2.4	Caracterización de Co.120 _c obtenida a partir de la fracción insoluble	58
3.2.5	Purificación y solubilización de la proteína Co.120 _c	59
3.2.6	Caracterización de la proteína Co.120 _c por cromatografía de exclusión molecular	60

3.2.7	Caracterización de la proteína Co. 120 _e por ME	61
3.2.8	Formación de complejos ADN plasmídico-Co. 120, recombinante	61
3.2.9	Caracterización de los complejos ADN plasmídico-Co. 120, recombinante en gradientes de sacarosa	62
3.3	Antigenicidad e inmunogenicidad de las proteínas P21 y Co. 120, recombinantes.....	64
3.3.1	Antigenicidad de las proteínas P21 y Co. 120, recombinantes	64
3.3.2	Respuesta inmune de anticuerpos y linfoproliferativa inducida en ratones por P21 y Co. 120, 64	
3.3.3	Evaluación de la respuesta DTH inducida en ratones por la proteína Co. 120,.....	65
3.3.4	Evaluación de la respuesta inmune inducida en ratones por la proteína Co. 120, con diferentes adyuvantes	66
3.3.4.1	Generación de anticuerpos IgG específicos para Co. 120 _e	66
3.3.4.2	Generación de respuesta linfoproliferativa específica para Co. 120 _e	67
3.3.4.3	Experimentos de protección contra virus vaccinia recombinante	68
4	DISCUSION.....	70
4.1	Obtención de HCcAg en la levadura <i>Pichia pastoris</i> y su procesamiento	70
4.2	Multimerización y particulación de la proteína HCcAg obtenida de la levadura <i>Pichia pastoris</i>	73
4.3	Ensamblaje <i>in vitro</i> de P21 en partículas semejantes a la cápsida del VHC.....	75
4.4	Obtención de la proteína Co. 120, en <i>Escherichia coli</i>	76
4.5	Evaluación de la multimerización y particulación de la proteína Co. 120, obtenida en <i>Escherichia coli</i>	78
4.5.1	Estudio de Co. 120, presente en la fracción soluble de la ruptura.....	78
4.5.2	Purificación y ensamblaje <i>in vitro</i> de Co. 120,.....	78
4.6	Formación de complejos ADN plasmídico-Co. 120, recombinante	79
4.7	Antigenicidad e inmunogenicidad de P21 y Co. 120,	80
4.8	Consideraciones generales	84
5	CONCLUSIONES.....	86
6	RECOMENDACIONES.....	87
7	REFERENCIAS	
8	AUTOBIBLIOGRAFÍA RELACIONADA CON LA TESIS	
9	ANEXO	
9.1	Anexo 1	



LISTA DE ABREVIATURAS

aa	Aminoácido (s)
AcM	Anticuerpo monoclonal
Acs	Anticuerpos
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ALT	Alanina-amino transferasa
ARN	Ácido ribonucleico
BSA	Albúmina sérica bovina
<i>Col20</i>	Variante génica que contiene la región codificante para los primeros 120 aa de la proteína de la cápsida del VHC
<i>Col 76</i>	Variante génica que contiene la región codificante para los primeros 176 aa de la proteína de la cápsida del VHC
<i>CoEl</i>	Variante génica que contiene la región codificante para los primeros 339 aa de la poliproteína del VHC
<i>Col20_e</i>	Variante de la proteína de la cápsida codificada por <i>Col20</i> que se obtiene en <i>E. coli</i>
<i>Col20_L</i>	Variante de la proteína de la cápsida codificada por <i>Col20</i> que se obtiene en <i>P. pastoris</i>
<i>Col176_L</i>	Variante la proteína de la cápsida codificada por <i>Col 76</i> que se obtiene en <i>P. pastoris</i>
C-El _e	Variante de la poliproteína del VHC que contiene las proteínas de la cápsida y El codificada por <i>CoEl</i> que se obtiene en <i>E. coli</i>
C-El _L	Variante de la poliproteína del VHC que contiene las proteínas de la cápsida y El codificada por <i>CoEl</i> que se obtiene en <i>P. pastoris</i>
cpm	Conteos por minuto
Da	Daltons
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfatos
DO	Densidad óptica
DTH	Respuesta de hipersensibilidad retardada
EDTA	Ácido etilén-diamino-tetracético
FAS	Receptor de la superficie celular (Apo-I/CD95) que puede transmitir señales de apoptosis
g	Gravedades
Gen <i>c-myc</i>	Proto-oncogen
Gen <i>c-fos</i>	Proto-oncogen
Gen <i>ras</i>	Encogen
Receptor gC 1 q	Receptor del componente C1 q del complemento h Horas
HBcAg	Proteína de la cápsida del VHB
HBsAg	Proteína de la envoltura del VHB
HCCAg	Proteína de la cápsida del VHC (la forma inmadura abarca 191 aa y la forma madura 173 aa)
HNANB	Hepatitis post-transfusionales no-A, no-B
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i> (cromatografía líquida de alta eficacia)
IE	índice de Estimulación
IME	Inmuno-microscopía electrónica
INFy	Interferón y
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactopiranosido
IRES	Sitio de entrada interna al ribosoma

Abreviaturas

ISCOMs	<i>Immuno Stimulant Complexes</i> (complejos inmuno-estimuladores)
kb	1000 pares de bases
kDa	1000 Daltons
ME	Microscopía electrónica de transmisión
min	Minutos
NF-κB	Factor transcripcional eucariótico
LPS	Lipopolisacárido
PAGE	<i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i> (electroforesis en geles de poliacrilamida)
pb	Pares de bases
PEG	Polietilenglicol
PI	Punto isoeléctrico
PMN	Linfocitos polimorfonucleares
PSV	Partículas semejantes a virus
P21	Forma madura de la proteína HCCAg de 21 kDa reportada en la literatura
P23	Forma inmadura de la proteína HCCAg de 23 kDa reportada en la literatura
P21	Proteína HCCAg de 21 kDa reportada en este trabajo
P23	Proteína HCCAg de 23 kDa reportada en este trabajo
p53	Proteína supresora de tumores
RCP	<i>pcr-polymerase chain reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
RE	Retículo endoplásmico
rp	<i>reverse-phase</i> (fase inversa)
rpm	Revoluciones por minuto
s	Segundos
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TFA	Ácido trifluoroacético
Th1	Respuesta T auxiliadora de tipo 1
Th2	Respuesta T auxiliadora de tipo 2
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
Tris	Tris (hidroximetil)-metilamina
3'NTR	Región 3' no traducida
5'NTR	Región 5' no traducida
VHB	Virus de la Hepatitis B
VHC	Virus de la Hepatitis C
VHNANB	Virus de la Hepatitis no-A no-B

1 INTRODUCCIÓN

La infección causada por el virus de la hepatitis C (VHC) se considera un problema de salud mundial. Actualmente existen más de 170 millones de personas infectadas por este patógeno en el ámbito internacional. El VHC no sólo produce la hepatitis aguda por infección transitoria, sino también la hepatitis crónica que conduce a la cirrosis hepática en el 20% de los casos y de éstos, el 5% desarrolla hepatocarcinoma celular. Los estudios indican que existe una persistencia viral del 70% al 80% en los individuos que se infectan con el virus (1;2). En Cuba, los estudios de prevalencia mostraron un índice de 1,2% de presencia de anticuerpos específicos para el VHC en la población estudiada (3). En la actualidad no se dispone de una vacuna contra este patógeno y las terapias disponibles son efectivas sólo hasta en un 40% de los casos (4). Por esto, el desarrollo de una vacuna contra este patógeno viral constituye una prioridad sanitaria en la actualidad.

El VHC presenta diversas características biológicas que dificultan su estudio y frenan el desarrollo de agentes antivirales y vacunas. Entre las más importantes se encuentran: los bajos títulos de partículas infecciosas en la sangre y el hígado, la ausencia de un cultivo *in vitro* estable para el virus, y el hecho de ser el chimpancé el único modelo animal natural disponible. Además, se conoce poco acerca de la vía de ensamblaje *in vivo*, así como de la estructura de la nucleocápsida y el virion del VHC, ya que no se dispone de cantidades suficientes del virus purificado que permitan realizar estudios estructurales y biofísicos detallados. Esto obligó a los investigadores a utilizar los métodos de ingeniería genética para el aislamiento del VHC y el estudio de las diferentes proteínas virales y sus funciones (5).

El VHC es un virus de ARN de simple cadena de polaridad positiva que pertenece al género Hepacivirus dentro de la familia Flaviviridae. El ARN viral mide 9,6 kb y contiene un marco abierto de lectura que codifica para una poliproteína precursora de 3 010-3 011 aa, que se procesa proteolíticamente por una combinación de proteasas virales y del hospedero. Este procesamiento da lugar a las proteínas necesarias para el ensamblaje y la replicación viral (cápsida (HCcAg), E1, E2, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (6).

La respuesta inmune frente a la infección natural por el VHC es generalmente insuficiente (7). Se plantea que la alta variabilidad de los antígenos de la envoltura (E1 y E2) pudiera ser la causa de que la respuesta inmune humoral dirigida contra éstos sea inefectiva para proteger contra todas las variantes o que sea sólo protectora para la variante viral del mismo aislamiento (8). No obstante, los estudios recientes sugieren la importancia

Introducción

de una respuesta inmune humoral y celular temprana, diversa y potente para la protección contra el virus (9; 10).

Se considera que la proteína HCcAg es el principal componente de la cápsida viral (6). Los estudios indican que la forma preliminar de procesamiento de la proteína HCcAg es una proteína de 23 kDa (*P23*), compuesta de 191 aminoácidos y no glicosilada. La maduración de la proteína ocurre de manera postraduccional rindiendo un producto final que solo comprende hasta el aa 173 (*P21*) del precursor inicial (11). *P21* es considerada la proteína madura de la nucleocápsida del virus y fue la forma detectada en las partículas virales aisladas del suero de individuos infectados con el VHC (12).

HCcAg es una proteína altamente conservada entre los diferentes aislamientos, y presenta numerosos epitopos reconocidos por linfocitos T citotóxicos y auxiliares. Este reconocimiento es más frecuente en los pacientes que se recuperan de la enfermedad, y en los individuos que están expuestos al virus y no se enferman (10; 13). Por esto, el HCcAg pudiera ser un componente importante en futuras vacunas de amplio espectro contra el VHC.

Por otro lado, diferentes estudios mostraron la obtención de cápsidas de varios agentes virales en diferentes microorganismos (14; 15). Además, estos antígenos particulados mostraron ser potentes inmunógenos, capaces de inducir no sólo una fuerte respuesta humoral, sino también celular (16; 17). Incluso en un caso de virus envuelto como el virus de la hepatitis B (VHB), donde la cápsida constituye un antígeno interno del virión, la inmunización con la cápsida puso de manifiesto una protección parcial en humanos y marmotas (18-20).

Teniendo en cuenta los elementos anteriormente expuestos se definió la siguiente **hipótesis de trabajo**: "Es posible obtener variantes recombinantes de la proteína de la cápsida del virus de la hepatitis C que se ensamblen en partículas, con características físico-químicas e inmunológicas parecidas a la reportada para la cápsida producida por la infección natural".

Para investigar la validez de esta hipótesis nos propusimos los siguientes objetivos y tareas:

Objetivo 1:

Obtener la proteína recombinante HCcAg del virus de la hepatitis C sintetizada en Pichia pastoris con un procesamiento y una conformación capaz de generar partículas parecidas a la cápsida natural del VHC.

Introducción

Tareas:

1. Clonación y expresión en *P. pastoris* de una variante del gen que codifica para la poliproteína del VHC que comprende la proteína HCcAg y los primeros 148 aa de la proteína EI (C-EI₁).
2. Caracterización del procesamiento de C-EI₁ y de las partículas de HCcAg obtenidas a partir de *P. pastoris*.
3. Purificación de la proteína HCcAg recombinante, y estudio *in vitro* de su ensamblaje en partículas semejantes a la cápsida viral.

Objetivo 2:

Obtener una variante truncada de la proteína recombinante HCcAg del virus de la hepatitis C sintetizada en Escherichia coli con una conformación capaz de generar partículas parecidas a la cápsida natural del VHC.

Tareas:

4. Clonación y expresión en *E. coli* de una variante génica de HCcAg compuesta por los primeros 120 aa (Co.120_e).
5. Caracterización de las partículas obtenidas en *E. coli*.
6. Purificación de la proteína Co. 120_e recombinante y estudio *in vitro* de su ensamblaje en partículas semejantes a la cápsida viral.
7. Estudio funcional *in vitro* de la interacción de la proteína recombinante Co.120_e y ADN plasmídico.

Objetivo 3:

Estudiar las características antigénicas e inmunogénicas de las variantes de la proteína recombinante HCcAg.

Tareas:

8. Estudio de la antigenicidad de las partículas de HCcAg obtenidas en *P. pastoris* y *E. coli* frente a sueros de pacientes infectados con el VHC.
9. Estudio en ratones de las respuestas de anticuerpos IgG específicos y linfoproliferativa inducidas por las partículas de HCcAg obtenidas en *P. pastoris* y *E. coli*.
10. Estudio en ratones de la respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) inducida por las partículas de HCcAg obtenidas en *E. coli*.
11. Estudio en ratones de la respuesta inmune específica y anti-viral inducida por las partículas de Co. 120_e obtenidas en *E. coli* y en formulación con adyuvantes.

Este trabajo consta de los siguientes elementos científicos **novedosos**:

La obtención de la proteína HCcAg de un aislamiento cubano en microorganismos.

Introducción

El procesamiento de la proteína HCcAg en la levadura *P. pastoris* en forma similar a como ocurre en células de organismos superiores.

La obtención de partículas formadas por la proteína HCcAg a partir de *P. pastoris*, con características estructurales parecidas a la cápsida natural del VHC. Se identificó a P21 como el componente de estas partículas.

La purificación de la proteína P21 derivada de *P. pastoris* en forma monomérica y su ensamblaje *in vitro* en partículas con características estructurales y antigénicas parecidas a la cápsida natural del VHC.

La obtención de partículas formadas por la proteína HCcAg truncada a partir de *E. coli*, con características estructurales parecidas a la cápsida natural del VHC.

La purificación de la proteína HCcAg truncada derivada de esta bacteria recombinante en forma monomérica y su ensamblaje *in vitro* en partículas con características estructurales y antigénicas parecidas a la cápsida natural del VHC.

Estos resultados fueron publicados, informándose por primera vez a la comunidad científica.

La **importancia práctica** de este trabajo consiste en la obtención de partículas parecidas a la cápsida del VHC, que pueden constituir un modelo para el estudio de la morfología y el ensamblaje viral. También los resultados pudieran ser utilizados en el diseño de medicamentos preventivos y terapéuticos contra el VHC. De igual forma, su posible utilización como portador de otros antígenos pudiera ser de gran utilidad práctica. La **importancia teórica** de este trabajo consiste en que la demostración de la capacidad intrínseca de la proteína HCcAg de ensamblarse en partículas constituye un valioso aporte al estudio de la morfogénesis y ensamblaje del VHC. Además, el conjunto de las técnicas empleadas constituye un **aporte metodológico** al estudio de los antígenos virales en el país.

La tesis consta de Introducción, Revisión Bibliográfica, Materiales y Métodos, Resultados, Discusión, Conclusiones, Recomendaciones, Referencias Bibliográficas, Anexos y Autobiografía. Los resultados de este trabajo han sido expuestos en varias conferencias nacionales e internacionales y forman parte de una publicación nacional y ocho internacionales. Parte de este trabajo está incluido en una patente internacional publicada y otra aceptada en Cuba. Los resultados de este trabajo están avalados por dos logros del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología y un premio anual de la Academia de Ciencias de Cuba.

Esta investigación se desarrolló en el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología

Introducción

de La Habana, Cuba, y se presentó ante el Consejo Científico y el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Biología de la Universidad de La Habana.



2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 Antecedentes históricos del virus de la hepatitis C (VHC)

En 1940 se describió el origen viral de una parte importante de las hepatitis, acumulándose hasta la fecha una valiosa información sobre las mismas. El descubrimiento del “antígeno de Australia” (21) y su asociación como marcador de la infección por el virus de la hepatitis B (VHB) (22), así como la visualización de la partícula de 27 nm del virus de la hepatitis A (VHA), hicieron posible el desarrollo de ensayos de diagnóstico para la detección de ambos virus (23). No obstante, ciertas evidencias influyeron definitivamente para que los investigadores aceptaran la idea de la existencia de otros agentes etiológicos, que sólo podían ser diagnosticados por exclusión y a los que denominaron virus de la hepatitis no-A, no-B (VHNANB). La evidencia más fuerte era la aparición de casos de hepatitis en pacientes negativos a los marcadores del VHA y del VHB y con características clínicas diferentes de los virus descritos hasta ese momento (24).

En 1978 se obtuvieron resultados satisfactorios en experimentos de transmisión de la enfermedad a chimpancés, que establecieron el carácter infectivo del VHNANB (25). Posteriormente, Choo y colaboradores en 1989 lograron identificar el agente causal de la mayoría de las hepatitis post-transfusionales no-A, no-B (HNANB), que se denominó virus de la hepatitis C (VHC). Este resultó ser el primer virus descrito, caracterizado y diagnosticado por el empleo de las técnicas de ingeniería genética antes de su aislamiento y visualización mediante las técnicas tradicionales de la virología y la inmunología (5;25).

1.2 Características generales del VHC. Biología molecular del virus.

El VHC es un virus de ARN de simple cadena de polaridad positiva que pertenece a la familia Flaviviridae, y muestra gran semejanza con los géneros Flavivirus y Pestivirus. Actualmente se ubica en el género Hepacivirus (26;27). Se estima que el virión posee un diámetro que oscila entre los 50 y los 75 nm y que está formado por una envoltura externa lipoproteica que rodea a una cápsida nuclear en cuyo interior se encuentra el material genético (28).

La utilización de las técnicas de ingeniería genética determinaron que el ARN viral mide 9,6 kb y contiene un marco abierto de lectura que codifica para una poliproteína precursora de 3 010-3 011 aa. Ésta se procesa proteolíticamente por una combinación de proteasas virales y del hospedero, dando lugar a las proteínas necesarias para el ensamblaje y la replicación viral (**Figura 1**) (29).

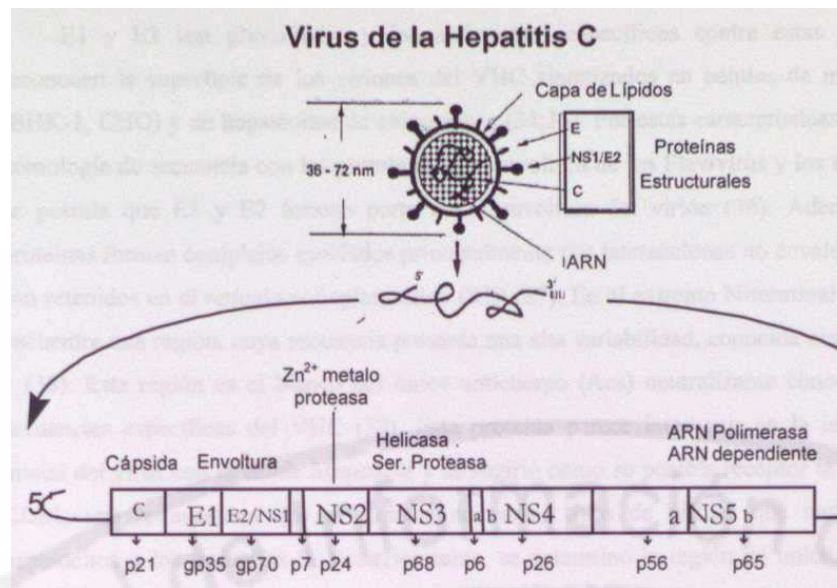


Figura 1. Esquema de la organización genómica del VHC y del procesamiento de las proteínas estructurales y no estructurales así como la posible función de algunas de ellas. C: HCcAg; E1, E2: proteínas de la envoltura; NS2-NS5: proteínas no estructurales.

El genoma contiene hacia el extremo 5' una región no traducida (5'RNT) de 341 nucleótidos altamente conservados que presenta una identidad de secuencia nucleotídica de más de un 90% entre 81 aislamientos diferentes (30). Esta región forma estructuras secundarias y terciarias complejas con importancia funcional. Además, contiene múltiples codones AUG antes del sitio de inicio de la traducción, así como regiones que se supone intervienen en la replicación y en la traducción. Este es el caso de los elementos que funcionan como sitios de entrada interna del ribosoma (IRES) y que pudieran diferenciar la traducción del genoma viral de la traducción de los ARNm celulares (31).

A continuación se encuentran los genes que codifican para las proteínas estructurales: una proteína que constituye la cápsida del virión (HCcAg), dos glicoproteínas de la envoltura (E1 y E2) y un pequeño polipéptido de función desconocida (p7). Hacia el extremo 3' se encuentran los genes que codifican las proteínas no estructurales (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B) (32).

La proteína HCcAg se encuentra hacia el extremo amino terminal (N-terminal) de la poliproteína viral, se postula que su forma inmadura abarca los primeros 191 aa y presenta un alto contenido de aa básicos (arginina y lisina). Esta propiedad es característica de las

Resultados

proteínas que interactúan con los ácidos nucleicos (33).

El y E2 son glicosiladas y los anticuerpos específicos contra estas proteínas reconocen la superficie de los viriones del VHC sintetizados en células de mamíferos (BHK-1, CHO) y en hepatocitos de chimpancés (34;35). Por estas características y por su homología de secuencia con las proteínas de la envoltura de los Flavivirus y los Pestivirus se postula que El y E2 forman parte de la envoltura del virión (36). Además estas proteínas forman complejos asociados principalmente por interacciones no covalentes, que son retenidos en el retículo endoplasmático (RE) (37). En el extremo N-terminal de E2 se encuentra una región, cuya secuencia presenta una alta variabilidad, conocida como RHV- 1 (38). Esta región es el blanco del único anticuerpo (Acs) neutralizante conocido para secuencias específicas del VHC (39). Esta proteína parece intervenir en la interacción inicial del virus con la célula hospedera y se sugirió como su posible receptor la molécula CD81, una tetraspanina que se expresa en varios tipos de células que incluyen los hepatocitos y los linfocitos B. Posteriormente, se determinó la región de unión de E2 al lazo mayor extracelular de CD81 y se observó que los anticuerpos neutralizantes del virus generados *in vivo* inhibieron la unión de E2 a CD81 *in vitro* (40). Recientemente, se identificó la molécula CD209L como otro posible receptor del VHC (41). Esta molécula es una lectina que se expresa en las células endoteliales del hígado y de los nodulos linfáticos. Se demostró que E2 interactuó específicamente con CD209L (41).

A continuación de las regiones que codifican las proteínas estructurales se encuentran las secuencias que codifican para las proteínas no estructurales en el siguiente orden: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Estas proteínas tienen funciones enzimáticas, e incluyen al menos dos proteasas, una polimerasa y una helicasa (42).

NS2 es una proteína hidrofóbica de membrana que se localiza en el RE y tiene un peso molecular de 23 kDa (43). Aunque algunos estudios sugieren que NS2 pudiera intervenir en el procesamiento de la poliproteína viral su función biológica es desconocida (44). Trabajos recientes indican que esta proteína pudiera inhibir el proceso de apoptosis celular (45) y la expresión génica a partir de determinados promotores celulares y virales (46). Estos estudios sugieren que NS2 interviene en la patogénesis de la infección crónica inducida por el VHC.

NS3 es una proteína de 70 kDa que presenta tres actividades enzimáticas (47): una proteasa del tipo serina y una combinación de funciones helicasa-NTPasa. Además, NS3 puede afectar varias funciones celulares y contribuir a la patogénesis inducida por el VHC (48).

NS4A puede mediar la asociación de NS3 con la membrana del RE y facilitar su función de proteasa (49). NS4B es una proteína de 27 kDa poco conocida, aunque parece formar parte del supuesto complejo de replicación viral (49).

La función de NS5A en el ciclo de vida del VHC todavía no se conoce. En esta proteína existe una región asociada a la sensibilidad del subtipo Ib del VHC al tratamiento con IFN-a (50). Por otra parte, la proteína NS5B tiene una función similar a la enzima ARN polimerasa que depende de moldes de ARN y presenta 4 aminoácidos cruciales para su actividad. Cualquier cambio en estos aminoácidos disminuye su actividad enzimática (51). Se observó que esta proteína tiene una localización perinuclear. Su interacción con las membranas sugiere que la replicación del VHC puede ocurrir asociada al RE alrededor del núcleo (52). Los trifosfatos de rivavirina no tienen efecto inhibitorio sobre esta actividad polimerasa, por esto se sugirió que el efecto terapéutico observado en algunos pacientes no está relacionado con la inhibición de la polimerasa (53).

Hacia el extremo 3' del genoma se encuentra la región 3' no traducida (3'RNT). Esta región está compuesta por una secuencia variable de 40 nucleótidos, una cola de poliuracilo que es heterogénea y una región de 98 nucleótidos altamente conservada y esencial para la replicación viral (54).

1.3 Heterogeneidad del VHC y evasión de la respuesta inmune

Los análisis basados en la comparación de secuencias totales o parciales del genoma del VHC, revelaron la existencia de una alta variabilidad, tan acentuada como en los virus de simple cadena de ARN (55). La alta frecuencia de mutaciones que tienen lugar durante la replicación viral pudiera explicarse porque la enzima ARN polimerasa dependiente de ARN no presenta la actividad correctora de lectura que sí presentan las polimerasas de ADN (9). Se observó que las mutaciones no se distribuyen homogéneamente a lo largo del genoma del VHC, sino que se favorecen aquellas relacionadas con la evasión de la respuesta inmune. Estas mutaciones se localizan en las proteínas de la envoltura, donde se encuentran los principales epitopos reconocidos por los Acs neutralizantes, y no en aquellas proteínas vinculadas con otras funciones esenciales para la replicación viral (9).

El virus posee la capacidad de mutar rápidamente (entre 10^{-3} y 10^{-4} sustituciones de bases por sitio del genoma por año). Por esto, es posible encontrar en un único individuo infectado una serie relacionada de diferentes genomas del virus (56;57). Uno de estos pudiera convertirse en la cepa dominante por la adaptación del virus a los cambios ambientales, como la presión del sistema inmunológico o el cambio de hospedero. A este

Resultados

fenómeno se le denominó dinámica de “cuasiespecies” y se presume que proporcione al virus un mecanismo rápido y eficiente para escapar a la respuesta inmune del hospedero (56;57).

En la segunda Conferencia Internacional del VHC y virus relacionados, Simmonds y colaboradores propusieron un sistema de nomenclatura consenso para ser utilizado en los estudios futuros del VHC (58). Según este sistema, el VHC se clasifica en base a la similitud de la secuencia nucleotídica por tipos genéticos principales denominados genotipos. Estos son enumerados en el orden de su descubrimiento por el sistema de números arábigos. La mayoría de las cepas del VHC que están más relacionadas dentro de algunos tipos son llamados subtipos, que son designados por letras en orden alfabético, según su descubrimiento (Ejemplos 1a, 1b, 2a, 2b,...).

Hasta el presente se identificaron al menos seis genotipos principales del VHC en todo el mundo (59). La relación de los genotipos con la progresión de las enfermedades del hígado, el resultado de la infección y la respuesta a la terapia con IFN, no está dilucidada (60). El estudio de estos resultados se dificulta por la larga historia natural, de forma asintomática, de la infección por el VHC y la carencia de información sobre el tiempo exacto de exposición a la infección. Los genotipos se diferencian en la carga viral, la generación de respuesta de Acs específica y la respuesta clínica al tratamiento con interferón, lo que dificulta el diagnóstico y la terapéutica (61).

1.4 Epidemiología

Actualmente se estima que 170 millones de personas o más están infectadas crónicamente con el VHC en el mundo (62). En Cuba, se estimó una prevalencia de anticuerpos anti-VHC de 1,12% (3). Esto indica que 120 000 personas o más pudieran ser portadoras del virus. No obstante, existen provincias como Guantánamo y Ciego de Ávila donde la prevalencia alcanzó un 1,8 y 1,9%, respectivamente. Las provincias Ciudad Habana y Habana, que acumulan grandes densidades de población, mostraron una prevalencia de un 1%, similar al promedio nacional (3).

La epidemiología del VHC es similar en algunos aspectos a la del VHB y del virus de la hepatitis D (VHD) en lo referente a la correlación entre la exposición a los productos derivados de la sangre y la infección (2). Los primeros estudios de la prevalencia del VHC (en individuos receptores de transfusiones y en personas con condiciones médicas asociadas con una alta frecuencia de transfusión sanguínea como la hemofilia, la talasemia, el fallo renal crónico y la cirugía del corazón) demostraron que los altos índices de

HNANB detectados en estos grupos estaban relacionados con la infección por el VHC (63).

Mediante una prueba de detección de Acs anti-VHC por ELISA en los bancos de sangre se pudieron identificar las donaciones infectadas con el virus y así disminuir la incidencia de las hepatitis parenterales (64). No obstante, la aplicación de esta prueba de Acs anti-VHC en los donantes no elimina totalmente el riesgo de adquirir el VHC después de la transfusión (65).

Los principales grupos de riesgo de infección con este virus son, primeramente, los hemofílicos y adictos al consumo de drogas por vía intravenosa, con una prevalencia del 60 al 90% (66). En segundo lugar, los hemodializados con hasta más de un 70% de seropositividad (67). Los tatuajes también se asociaron al riesgo de contraer la infección por el VHC (68).

Las evidencias de transmisión del VHC por contacto sexual son contradictorias en dependencia de las metodologías y las poblaciones estudiadas. En estos estudios se observó una prevalencia entre el 1,7% y el 16% (69-71). Por otra parte, la transmisión del VHC por convivencia no está bien estudiada, ya que no es posible descartar el contacto sanguíneo a través del daño de las mucosas y el uso de jeringuillas reutilizables. Las frecuencias determinadas en este grupo se encuentran entre el 0.2 y el 2.2% (72). La transmisión perinatal se documentó en diferentes estudios con una frecuencia que fluctúa entre el 0% y el 7% (73-75). También se estudió en los casos de madres co-infectadas con el VHC y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), donde la prevalencia de la infección por el VHC aumentó, con valores entre un 5% y un 36% (75;76). Los estudios de transmisión del VHC a través del contacto sexual, la convivencia con personas infectadas con el VHC y entre la madre infectada y el recién nacido presentan algunos resultados contradictorios. No obstante, la frecuencia de transmisión del VHC es menor en comparación con la observada para el VIH y el VHB por estas rutas (72).

La evaluación de la infección ocupacional con el virus demuestra que es un fenómeno poco frecuente, con una prevalencia entre el 0 y el 2% (77). Finalmente, los estudios epidemiológicos demuestran que entre el 30 y el 50% de los casos infectados por el VHC se desconoce la causa de la infección (72).

1.5 Respuesta inmune

La inmunidad inducida por la infección natural con el VHC es generalmente débil e inefectiva para proteger contra la infección viral (78). Sin embargo, la aparición frecuente de formas leves o resueltas de la enfermedad producida por segundas infecciones con el

VHC indican que existe un determinado componente de inmunidad (62).

1.5.1 Respuesta de anticuerpos

En la enfermedad causada por el VHC, a diferencia de las seroconversiones clásicas de otras infecciones virales, no se genera una cinética de isotipos o un patrón ordenado de respuesta de anticuerpos contra las proteínas virales. Por esto, no se dispone de un patrón serológico que permita relacionar el estado de la enfermedad con la replicación viral, o realizar un pronóstico clínico de la infección o la terapia en estudio (79;80). Además, los Acs específicos se detectan tarde en el curso de la enfermedad (80;81).

Las regiones inmunodominantes del VHC reconocidas por la respuesta humoral específica contra el virus se localizan en las proteínas HCcAg, NS3 y NS4 (80;82;83). La proteína HCcAg genera los primeros Acs en sujetos que son asintomáticos así como en pacientes infectados, que pueden persistir después de la recuperación de la enfermedad (80;83). Diferentes estudios mostraron que la respuesta de Acs contra NS4 correlacionó positivamente con la actividad de la enfermedad hepática inducida por el VHC (80;84). Se sugirió además que los Acs producidos contra NS4 no tienen cualidades protectoras (80;85).

Resulta interesante destacar que varios trabajos indican que los Acs dirigidos contra la RHV-1 de E2 generan cierta reactividad cruzada (80;86). Además, la generación de una respuesta temprana de Acs anti-RHV-I se correlacionó con las formas de infección aguda resueltas. En los pacientes que desarrollan la infección crónica, estos Acs se generan tarde durante el curso de la infección y se mantienen hasta después de 17 años (87). Otra evidencia que indica la presencia de epitopos neutralizantes en E2, es la existencia y persistencia de altos títulos de Acs que inhiben la unión de la proteína E2 a células humanas (Hep G2) en los individuos que resuelven naturalmente la infección (88). Estos elementos indican que estos Acs pudieran ser de naturaleza protectora. No obstante, otros estudios postulan que estos Acs son generalmente específicos para el suero de donde se derivó la secuencia de RHV-I y con frecuencia son incapaces de reconocer las secuencias de RHV-I obtenidas del mismo individuo en un estado posterior de la infección (89).

Por otra parte, se plantea que los Acs que inhiben la unión de E2 con uno de sus posibles receptores, el CD81, pudieran ser protectores. La región de E2 que interactúa con CD81 es dependiente de su conformación e involucra los aa 480-493 y 554-569. Adicionalmente, los Acs presentes en sueros de conejos contra la región comprendida en los aa 517-535 de E2, evidenciaron su capacidad para impedir la unión de una E2 soluble a CD81. Además, los Acs contra esta región de E2 se observaron en el suero de un paciente

crónico que neutralizó un aislamiento homólogo del VHC inoculado en chimpancés (90).

1.5.2 Respuesta de linfocitos T CD4+

Aunque la respuesta celular de linfocitos T CD4+ (LT CD4+) parece ser insuficiente en la mayoría de los pacientes infectados con el VHC, varios estudios indican la importancia de esta respuesta en la clarificación viral (91). Los estudios sugieren que una respuesta temprana, vigorosa y multiespecífica de LT CD4+ favorece la resolución de la enfermedad y la inmunidad contra el virus. Por el contrario, una respuesta de LT CD4+ débil y tardía se relaciona con el establecimiento de la inmunopatología crónica del hígado (92).

Los antígenos más inmunogénicos reconocidos por los LT CD4+ son las proteínas HCcAg, NS3 y NS4 (91;93;94). Los estudios de la reactividad de los LT CD4+ específicos para el VHC presentes en humanos contra péptidos de las proteínas HCcAg y NS4, indican que la inducción de una respuesta vigorosa de este tipo, en las etapas tempranas de la infección, es importante para limitar la expansión viral así como para mantener bajo control la replicación del VHC (95). Por otra parte, un número creciente de evidencias indican que el patrón de citocinas secretadas por los LT CD4+ puede facilitar la erradicación de la infección cuando está dirigido hacia una respuesta auxiliadora de tipo 1 (Th1) (secreción de interleucina 2 (IL2) e interferón γ (IFN- γ)), o puede favorecer la persistencia viral, si está orientado hacia una respuesta auxiliadora de tipo 2 (Th2) (secreción de interleucinas 4 (IL4) y 10 (IL10)) detectadas en el suero de los individuos infectados (96).

Se observó que la mayoría de los LT CD4+ que infiltran el hígado con hepatitis crónica son capaces de secretar IFN- γ , en tanto que los niveles séricos del factor de necrosis tumoral (TNF α) varían con la severidad de la enfermedad (97). Otros resultados mostraron que la frecuencia de LT CD4+ específicos para el VHC es significativamente superior en el tejido hepático (donde reconocen simultáneamente a HCcAg y NS4) (98) que en la sangre periférica (99).

1.5.3 Respuesta de linfocitos T CD8+

La respuesta celular de linfocitos T CD8+ (LT CD8+) específicos para el VHC es generalmente insuficiente en los pacientes infectados para ayudar a la clarificación viral (100-102). No obstante se reconoce que tanto la respuesta de LT CD8+ como las citoquinas secretadas por estas células pueden desempeñar un papel importante tanto en la inhibición viral como en la inmunopatogénesis y particularmente en el daño hepático (10; 13; 100). Los LT CD8+ presentes en la sangre periférica y los que infiltran el hígado de

Resultados

pacientes crónicos infectados con el VHC reconocen epitopos de todas las proteínas del VHC (100; 103; 104).

Estudios realizados en chimpancés mostraron que aquellos animales que clarifican la infección generan una respuesta de LT CD8+ fuerte, temprana y multiespecífica, en contraste con aquellos animales que desarrollan una infección crónica, en los que se verifica una respuesta débil de LT CD8+, especialmente en los estadios más tempranos de la enfermedad (105). Además, se determinó que en los individuos infectados con el VHC la frecuencia de LT CD8+ específicos para el VHC en la sangre fluctúa entre el 0,01-1,2% del total de la población de LT CD8+ y que su fenotipo es consistente con el de células T de memoria en reposo (99).

Los estudios de la infección aguda en humanos revelaron que junto con el incremento en los niveles séricos de la enzima alanina-amino transferasa (ALT), se incrementan los LT CD8+ específicos para el VHC, aunque este incremento es temporal. Se detectaron además cambios rápidos en los marcadores fenotípicos y en la especificidad antigénica y se observó que el tiempo de aparición de los LT CD8+ se prolonga más allá del período agudo (10;99)

Todo lo anterior sugiere que la respuesta celular de LT CD4+ y LT CD8+ puede desempeñar un papel importante tanto en la protección contra el VHC como en la patogénesis causada por el VHC (99; 106).

1.5.4 Influencia de los haplotipos HLA y la variación de los epitopos en la respuesta inmune celular contra el virus de la Hepatitis C

Se observó que determinados factores como el tipo de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (HLA) del hospedero pueden influir en la inmunidad protectora generada por el sistema inmune del hospedero contra la infección causada por el VHC. Los individuos portadores de los alelos DRB1*04, DQA1*03 y DQB 1*0301 son más propensos a clarificar espontáneamente la viremia (99; 107). También los alelos DQB 1*0302, DRB1*1104 y DQA 1*0501 se asociaron con la protección (108). Por el contrario, el alelo DQB 1*0201, predispone a los individuos que lo portan a progresar hacia la cronicidad de la enfermedad causada por el VHC (109).

También se postula, que el sistema inmune no es capaz de adaptarse a la variación sostenida de las principales regiones antigénicas del virus. Se sugirió que la variación en los principales epitopos del VHC reconocidos por los LT CD8+ en chimpancés y humanos puede influir en el escape inmunológico, la persistencia del VHC y la patogénesis viral (110-114).

1.6 Inmunopatogénesis y hepatocarcinogénesis

El VHC pertenece a una familia de virus citopáticos (115) y el cuadro general histológico, de la hepatitis C crónica sugiere que este patógeno es citopático (85). Por otra parte, un número creciente de evidencias indican que el daño al conducto biliar es causado, al menos parcialmente, por el sistema inmune del hospedero. Otros datos clínicos apuntan hacia una participación decisiva de las proteínas virales en la regulación de la proliferación del hepatocito. Así, se reportó la formación de carcinoma hepatocelular en ratones transgénicos que expresaban constitutivamente la proteína HCcAg (116). Otras evidencias involucran a las proteínas virales NS3, NS4B y NS5A como potenciales especies oncogénicas (117; 118).

1.7 Estrategias terapéuticas y profilácticas

Los trece años subsiguientes al descubrimiento del VHC como el principal agente causal de las HANANB estuvieron colmados de esfuerzos (por parte de distintos grupos de investigadores de todo el mundo) para encontrar un producto antiviral o una vacuna con actividad terapéutica y/o profiláctica. Por una parte, se utilizó la terapia con IFN- α en el tratamiento de pacientes infectados por el VHC. Sin embargo, esta terapia es efectiva sólo en el 20-30% de los casos (119). A esto se añade el hecho de que la terapia con IFN- α genera numerosos efectos adversos, entre los que se incluyen: la fatiga, la depresión, las artralgias, la trombocitopenia, entre otros (120). Los estudios más prometedores mostraron que la combinación de IFN- α e INF- α pegilado con Ribavirina inducen una respuesta sostenida en el 40% de los pacientes con infección crónica (121). Estos resultados son alentadores e iniciaron una etapa de optimismo en la terapia del VHC. No obstante, es evidente que la terapia antiviral no es la solución para el VHC como pandemia, ya que una gran parte de los infectados por el VHC viven actualmente en los países del tercer mundo, donde no hay acceso a los medicamentos por los costos de estos tratamientos. Por esto, se considera importante el desarrollo de agentes vacunales efectivos contra el VHC.

Sin embargo, se plantea que existen tres obstáculos principales para el desarrollo de una vacuna efectiva contra el VHC:

- 1) El VHC persiste en el organismo en una distribución de “cuasiespecies” donde se observa una elevada frecuencia de mutaciones en la RHV-I, que se postula constituye el blanco epitópico principal para la respuesta humoral neutralizante.
- 2) La respuesta inmune contra las proteínas de la envoltura presenta una cinética lenta de aparición y no alcanza títulos elevados de Acs (122).

3) No existe un cultivo de tejidos conveniente para los ensayos de neutralización por Acs, o para la obtención de cepas atenuadas del VHC (8;78).

A pesar de estas limitaciones, se realizan muchos intentos en el desarrollo de vacunas. Inicialmente, se generó una vacuna recombinante de subunidades que incluía a las proteínas E1/E2. Este preparado vacunal fue capaz de inducir una inmunidad protectora frente al reto con cepas homólogas del VHC en chimpancés, pero no frente a cepas heterólogas del VHC (123). En otro estudio, la proteína recombinante E1 proveniente de un aislamiento del genotipo Ib fue purificada como homodímeros que se asociaban en partículas de 9 nm de diámetro (124). En un estudio realizado en chimpancés con infección crónica con el VHC se observó una asociación entre los altos niveles de anticuerpos contra la E1 y el mejoramiento de la enfermedad (124).

En otro estudio, se evaluó una vacuna compuesta por la proteína HCcAg formulada con ISCOMs. Ésta generó una fuerte respuesta de anticuerpos y de LT CD4+ y CD8+ en *Macacos rhesus* (125). La combinación HCcAg-ISCOM también potenció la respuesta inmune contra el heterodímero E1/E2.

Una de las estrategias que se emplea actualmente en la búsqueda de una vacuna efectiva contra el VHC se basa en la inmunización con ADN recombinante que codifica para las proteínas estructurales del virus. Dou y colaboradores en 1999 demostraron que plasmidios que expresaban las proteínas HCcAg, E1 y E2, generaban en ratones una respuesta de Acs específica y una respuesta linfoproliferativa (126). Diversos estudios también evidenciaron, con algún éxito, la influencia de diferentes vectores de ADN para potenciar la respuesta LT CD8+ (127).

La proteína HCcAg es el antígeno del VHC más estudiado mediante la metodología de inmunización con ADN. Se desarrollaron diferentes variantes y vectores de expresión, que incluyen el gen completo que codifica para la proteína HCcAg o formas truncadas del mismo. También se diseñaron plasmidios que expresaron la región estructural completa del VHC. Diversas inmunizaciones en ratones con estas construcciones evidenciaron su capacidad para inducir una respuesta inmune humoral y celular específica (127-132). Esto sugiere que la inmunización con el gen que codifica para la proteína HCcAg es un método promisorio de vacunación contra la infección.

Otra alternativa es la inmunización con partículas semejantes a virus (PSV) que contienen todas las proteínas estructurales del VHC. Lo novedoso y a la vez ventajoso de esta variante, es que en estas partículas, las proteínas se presentan en su conformación nativa. Además, la naturaleza particulada de estos antígenos favorece la inducción de una

fuerte respuesta de LT CD8+. Esto permite un reconocimiento más adecuado de los determinantes antigénicos, que generan una respuesta inmune tanto humoral como celular (133-136).

1.8 La proteína de la cápsida (HCcAg)

1.8.1 Biosíntesis y propiedades bioquímicas.

La proteína HCcAg es rica en aminoácidos básicos (arginina y Usina) y residuos de prolina. Los estudios indican que la forma preliminar de procesamiento de la proteína HCcAg es una proteína de 23 kDa (*P23*), compuesta de 191 aminoácidos y no glicosilada. Una variante de la proteína HCcAg de este tamaño se identificó tanto en experimentos *in vitro* como *in vivo* en células de organismos superiores (6;29). El extremo C-terminal de la secuencia de esta proteína contiene dos dominios hidrofóbicos (43). El primer dominio hidrofóbico comprende la secuencia desde el aa 121 hasta el 151. El segundo se localiza inmediatamente antes de la secuencia de la proteína El y se considera que es una señal de translocación de El a través de la membrana del RE. Este dominio comprende la secuencia desde el aminoácido 170 hasta el 191. *P23* se sintetizó en diferentes sistemas de expresión (29). Inicialmente se procesa con el dominio hidrofóbico C-terminal retenido en la membrana del RE (43). La maduración de *P23* puede ocurrir de manera co-traduccional o postraduccional al ser escindido el dominio de retención en la membrana por enzimas asociadas a la membrana del RE, rindiendo un producto final que comprende hasta el aa 173 (*P21*) del precursor inicial (12;43; 137; 138). Esta proteína también se detectó en el suero de los individuos infectados con el VHC y se considera la forma madura de la proteína HCcAg (12).

1.8.2 Localización celular y función.

Se demostró que las dos formas (*P2J* y *P23*) coexisten, y que *P23* regula la localización celular de *P21* (137). Además, *P23* influye en la función reguladora de *P21* sobre la expresión del gen que codifica para el factor transcripcional p53 (138).

También se identificó una tercera variante de la proteína HCcAg de 16 kDa (139) presente solo en el genotipo la del VHC. La localización principal de esta proteína fue a nivel de núcleo celular.

En 1995, Suzuki y col. describieron para la proteína HCcAg tres regiones potenciales para la localización nuclear. Estas regiones se localizan fundamentalmente hacia la región N-terminal que es rica en aa con carga positiva (140). En experimentos de mutagénesis dirigida se logró la eliminación específica de cada dominio, lo que permitió discernir cuál de ellos era funcionalmente activo. Estos estudios demostraron que la región que

comprende los aa 38-43 fue suficiente para la localización nuclear de HCcAg. La secuencia comprendida en este dominio (38-PRRGPR-43) está bien conservada dentro de los diferentes subtipos del VHC aislados.

Los estudios de la localización celular de la proteína HCcAg resultan contradictorios, ya que en algunos casos se localizó en el citoplasma (140; 141) y en otros se observó tanto en el núcleo como en el citoplasma (12; 116; 139).

Las evidencias de la localización nuclear de la proteína HCcAg, y de la existencia de motivos de unión a ácidos nucleicos dentro de la secuencia de la proteína (33), sugirieron un posible papel funcional de la proteína HCcAg como reguladora de la expresión génica y de funciones celulares (142).

Este papel regulador de la proteína HCcAg se verificó en diferentes modelos experimentales. La proteína HCcAg regula a nivel de la transcripción varios genes celulares y virales. Estos incluyen *c-myc*, *c-fos*, y genes del VHB y del VIH (143-146). Además, se observó que el HCcAg, en cooperación con el oncogen *ras* puede transformar las células de roedor en un fenotipo tumoral (147). Por otro lado, la expresión de la proteína HCcAg en el hígado de un ratón transgénico causó carcinoma hepatocelular (CHC) (116). Estos estudios sugieren que la proteína HCcAg tiene propiedades oncogénicas que afectan las funciones normales de la célula, como la proliferación y la muerte celular.

También se observó que en dependencia de las líneas celulares utilizadas y de los tipos de transfectantes obtenidos, la proteína HCcAg puede estimular o suprimir la apoptosis inducida por FAS o TNF- α a través de la activación del factor transcripcional NF- κ B (148; 149). Además, la proteína HCcAg puede interactuar con varias proteínas y de esta forma regular determinadas funciones celulares. Por ejemplo, se demostró que esta proteína interactúa con el receptor gClq e inhibe la proliferación de los linfocitos T (150).

Algunos de estos resultados presentan contradicciones en dependencia de los modelos y condiciones experimentales utilizadas y deben ser confirmados en las condiciones reales de la infección por el VHC. No obstante, ellos indican que la proteína HCcAg presenta múltiples funciones y que puede desempeñar un papel importante en la patogénesis del VHC.

1.8.3 Ensamblaje y replicación.

En 1996 Matsumoto y colaboradores demostraron que la proteína HCcAg es capaz de interactuar de modo homotípico. Esto sugirió la posibilidad de la multimerización de HCcAg (151). Se determinó que esta propiedad se encuentra en la región comprendida

entre los residuos Leu36 y Leu91 (151), y entre Pro82 y Gly 102 (152). Además, se observó que la región entre los residuos Val 122 y Cys173 interviene en la formación del multímero de HCcAg (153).

Aunque *P21* es la forma detectada en las partículas virales aisladas del suero de individuos infectados con el VHC (12), recientemente se sugirió que *P21* y *P23* pueden formar un heterodímero en el citoplasma (138). Se supone que la asociación de la proteína HCcAg con la membrana sea importante para facilitar el ensamblaje y la liberación del virus siguiendo una vía similar a los Flavivirus y Pestivirus, cuya morfogénesis ocurre en asociación con las membranas intracelulares (154).

También se observó que la proteína HCcAg presenta actividad de unión a ARN y ribosomas, localizada fundamentalmente en una región que comprende los aminoácidos 1- 75, que es la más conservada y contiene un gran número de residuos de arginina (43). Es conocido que los aminoácidos básicos desempeñan un papel importante en las actividades de unión a ARN en varias proteínas (33). La interacción observada entre HCcAg-ARN es congruente con el supuesto papel estructural de esta proteína. Por otro lado, se postuló que la interacción de HCcAg con el ribosoma puede ser un paso importante en la desenvolvura del virión (43). Estos estudios indican que la proteína HCcAg puede tener un papel importante en la morfogénesis y en la replicación viral.

1.8.4 Propiedades Inmunológicas.

Utilizando péptidos sintéticos se determinó que los epitopos antigénicos de HCcAg reconocidos por la respuesta humoral, se encuentran hacia el extremo hidrofílico N- terminal (155).

Los anticuerpos contra la proteína HCcAg aparecen primero durante la infección, alrededor de la séptima u octava semanas de haberse iniciado el contacto con el virus (80). En la infección aguda por el VHC los anticuerpos contra esta proteína pueden ser encontrados en el 70-75% de los pacientes; en la infección crónica pueden detectarse en el 91 % de los casos (156).

Para el VHC se encontró una buena correlación entre una fuerte respuesta de linfocitos T CD4+ contra HCcAg y el curso clínico benigno de la infección viral (157). Como los antígenos nucleoproteicos son inherentemente menos variables que las proteínas de la envoltura pudieran tener la ventaja de proveer una protección potencialmente más amplia contra las cepas genotípicamente variables. Para la proteína HCcAg se describen además epitopos presentados en el contexto de las moléculas HLA clase I, que son reconocidos por los linfocitos T CD8+ con función citotóxica o secretores de INF- γ (158).

1.9 Expresión de proteínas heterólogas en *Escherichia coli* y en *Pichia pastoris*

La obtención de proteínas mediante la vía recombinante en microorganismos requiere la búsqueda de un huésped con características que garanticen la fácil manipulación del microorganismo y la ausencia de patogenicidad. Además, la proteína heteróloga debe alcanzar en el hospedero una estructura y conformación adecuadas, que posibiliten su actividad biológica. La expresión se debe optimizar de forma tal que se garantice que las cantidades de la proteína sean suficientes, para que el proceso de obtención asegure una producción rentable (159).

Un alto nivel de expresión del producto proteico requiere una modificación o una optimización de las señales de regulación. El nivel de síntesis en su medio celular depende de los pasos limitantes y la dificultad de tener varias posibilidades de regulación.

Los sistemas de expresión que tienen a *E. coli* como hospederos constituyen una herramienta poderosa para la producción de proteínas recombinantes. *E. coli* es el microorganismo más estudiado y conocido con respecto a su genética, su fisiológica y su bioquímica. Además, constituye una célula de rápido crecimiento, con requerimientos nutricionales simples (160). En este hospedero las proteínas recombinantes son activas y pueden imitar eficientemente la función de su contraparte original, si se producen en las condiciones apropiadas. Sin embargo, hay inconvenientes como son la producción de sustancias tóxicas, y la incapacidad de algunas proteínas heterólogas de adoptar la estructura tridimensional adecuada para su actividad biológica. Además, el producto resulta muchas veces insoluble y los pequeños polipéptidos están propensos a la degradación por proteasas. A pesar de las tentativas por solucionar estos problemas, las alternativas implementadas son satisfactorias sólo en algunos casos (160).

La levadura metilotrófica *P. pastoris* es la más desarrollada dentro de un pequeño grupo de especies de levaduras no convencionales, seleccionada por sus notables ventajas sobre *Saccharomyces cerevisiae* como hospedero para la expresión de genes heterólogos (161; 162). Por ser un organismo eucarionte, *P. pastoris* presenta muchas de las ventajas de los sistemas de expresión de los eucariontes superiores, como son: el procesamiento de las proteínas, su plegamiento y las modificaciones postraduccionales. También, este hospedero es de fácil manipulación como *E. coli* o *S. cerevisiae* (163). Adicionalmente, este sistema es más rápido, fácil y barato que otros sistemas de expresión eucarióticos, como los cultivos de tejidos de mamíferos, y generalmente los niveles de expresión son más altos (163). *P. pastoris* comparte con *S. cerevisiae* las ventajas de la manipulación genética y molecular, pero los niveles de expresión de las proteínas heterólogas son de 10 a 100 veces

Resultados

mayores que en esta última. Por esto, su utilización como sistema hospedero se difundió rápidamente. Además, esta levadura presenta otras características que facilitan su utilización con estos Unes, como por ejemplo, que puede crecer en cultivos continuos donde la densidad celular supere los 100 g/L en peso seco. El medio de cultivo de esta levadura es una mezcla definida de sales, elementos trazas, biotina y la fuente de carbono, lo que resulta poco costoso y se puede formular libre de pirógenos y toxinas (164). Otra característica de *P. pastoris* es que posee un fuerte mecanismo de regulación inducible: el promotor alcohol oxidasa (pAOXI), al que se halla fuertemente relacionada la capacidad metilotrófica de esta levadura (164).

1.10 Expresión de proteínas virales ensambladas en partículas semejantes a virus (PSV)

La síntesis de proteínas virales en diferentes sistemas constituye una metodología relativamente sencilla para el análisis de sus propiedades y funciones. Diferentes estudios mostraron que es posible la obtención de estructuras virales ensambladas en partículas semejantes a virus (PSV) por la expresión de varias proteínas virales. La historia de las PSV comenzó en los inicios de la década de los años 80 del siglo XX. Un aspecto importante que permitió su evolución fue el desarrollo previo de los sistemas de expresión heterólogos en *E. coli* y levaduras a finales de la década de los años 70. Esto permitió la utilización de estos sistemas para la expresión de las cápsidas y proteínas de las envolturas virales. Los primeros trabajos estuvieron relacionados con el VHB. Se observó que la proteína de la cápsida (HBcAg) expresada en *E. coli* y el antígeno de superficie pequeño (HBsAg) expresado en levaduras (*S. cerevisiae*) se ensamblaron en PSV (165; 166). Las PSV obtenidas presentaron características morfológicas e inmunológicas semejantes a las partículas naturales producidas por el VHB (166; 167). El desarrollo y la utilización de la vacuna del VHB estimularon a los investigadores a profundizar en este campo. El HBsAg se expresó y ensambló eficientemente en PSV en la levadura *P. pastoris* (168; 169). Además, las variantes mediana y larga del HBsAg se co-expresaron en *Hansenula polymorpha* donde se observó la formación de PSV (170).

Otra proteína que se expresó y se ensambló en PSV en *E. coli* fue la proteína gag del retrotransposon Tyl de *S. cerevisiae* (171). También, las proteínas de la cubierta de los fagos de ARN fr y MS2 se ensamblaron en *E. coli* (172). Otro ejemplo fue el ensamblaje en PSV de la proteína de la cubierta de un Potivirus en *E. coli* y levaduras (15).

El desarrollo de los sistemas de expresión en células eucariotas más evolucionadas y en particular del establecimiento del sistema de baculovirus utilizando diferentes tipos de

Resultados

células de insecto, constituyó un gran avance en la producción de PSV. Con la utilización de este sistema se logró la obtención de PSV a partir de varias proteínas virales en la década de los años 90. Por ejemplo:

-Se observó la formación de PSV con características similares a las naturales a partir de la co-expresión en las células de insecto *Spodoptera frugiperda* (SF9) de las proteínas estructurales VP2, VP4, VP6 y VP7 de Rotavirus (173).

-El componente principal de la cápsida de los Poliomavirus, la proteína VP1, se expresó a partir de un vector de baculovirus y se ensambló espontáneamente en PSV en el núcleo de células de insectos SF9 (174).

-Las proteínas estructurales pertenecientes a los virus relacionados con los Adenovirus se ensamblaron en PSV (175).

-Se obtuvieron PSV por la expresión de algunas proteínas estructurales del virus de la lengua azul (176).

-La expresión de proteínas del virus de la hepatitis A produjo la formación de PSV (177).

-Se observó la formación de PSV a partir de la expresión de la proteína de la cápsida de diferentes virus papiloma humano (VPH) (178; 179).

-La expresión de la proteína de la cápsida de Parvovirus produjo la formación de PSV (180).

-Se obtuvo el ensamblaje de la cápsida del virus "Norwalk" (181).

-Se observó el ensamblaje de PSV por la expresión de la proteína de la cápsida del virus de la rubéola (182).

-Se obtuvo el ensamblaje en PSV de las proteínas de varios retrovirus en especial de los lentivirus (183).

-El virus "Flock House" pertenece a la familia Nodaviridae y tiene como hospederos a algunos insectos.

La proteína de la cápsida de este virus se expresó y se observó la formación de PSV con características similares a los viriones nativos (184).

Un desarrollo novedoso de la temática es la producción de PSV en plantas transgénicas (185). Otro sistema utilizado para la producción de PSV son diferentes células de mamíferos. Como ejemplos podemos citar el HBsAg (186), la proteína gag del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (187) y las proteínas de la cápsida del VPH (188).

La co-expresión de varias proteínas virales permitió el estudio del proceso de ensamblaje en algunos modelos, como por ejemplo: el virus de la lengua azul (189) y el virus herpes simple (190).

Resultados

Los sistemas de expresión utilizando virus vaccinia recombinante también se utilizaron en la obtención de PSV. Como por ejemplo, en la síntesis del HBcAg (191) y de las proteínas j5R y j 13L del virus de la fiebre porcina africana (192).

1.10.1 Propiedades inmunológicas de las PSV

Las PSV tienen una amplia utilidad en los diagnósticos serológicos como en los casos del VHB, el VPH y las infecciones por Parvovirus. Para los virus que no se multiplican *in vitro* (Ejemplo: VPH) las PSV obtenidas por técnicas recombinantes brindan una posibilidad para el establecimiento de un sistema de diagnóstico serológico (193; 194; 194).

Las PSV tienen ventajas con respecto a los antígenos monoméricos para su utilización con fines vacunales. Éstas presentan cantidades importantes de determinantes antigénicos, en particular los de naturaleza conformacional que son importantes para la detección de los anticuerpos anti-virales. Estas estructuras son relativamente fáciles de purificar en el laboratorio. No presentan infectividad y son de bajo riesgo en comparación con los virus atenuados e inactivados. Los epitopos presentes en las PSV pueden presentarse por las moléculas de los complejos de histocompatibilidad I y II y generar la producción de anticuerpos y LT CD8+ (195). Por esto tienen la potencialidad de generar una respuesta inmune protectora contra las infecciones virales. Como ejemplo podemos citar, que la utilización de la proteína de la cápsida del VHB como vacuna brindó al menos una protección parcial en humanos y marmotas (18; 19; 196).

Otra utilización potencial de las PSV es en la terapia génica (197). Esta aplicación se basa en la función natural de las cápsidas virales de encapsidar los ácidos nucleicos virales. También las PSV se utilizan para presentar diferentes epitopos heterólogos al sistema inmune. La razón principal de la aplicación de estos quiméricos para la creación de vacunas, fue la baja inmunogenicidad de los péptidos sintéticos. Para aumentar su inmunogenicidad estos se acoplaron a los genes de las PSV. De esta manera, varias moléculas de los epitopos de interés quedan representadas en cada partícula portadora. Los primeros trabajos se realizaron con el antígeno de la cubierta del virus del mosaico del tabaco (198), el HBsAg (199) y el HBcAg (200;201). Otra ventaja de estos antígenos de fusión es la inducción de una respuesta inmune sin adicionar adyuvantes o utilizar un adyuvante que sea permisible en humanos o en la veterinaria (202). Además de inducir una respuesta de Acs contra los epitopos heterólogos, estos antígenos pueden inducir una respuesta de LT CD8+ específicos para estos epitopos (203).

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Plasmidios y aislamiento viral utilizados

Todos los clones del VHC utilizados en este trabajo pertenecen a un aislamiento cubano obtenido en nuestro laboratorio (204). Algunos de los plasmidios utilizados en este trabajo se muestran en las **Figuras 2, 3, 4 y 5** y son los siguientes: Plasmidios construidos en el laboratorio previo a este trabajo, (a) pBEI.Co.120, plasmidio que contiene el gen *Col20* de un aislamiento cubano del VHC (204) que codifica para los primeros 120 aa de la poliproteína viral (pertenecientes a la proteína HCcAg), (b) pXEI.CoEI.SK, plasmidio que contiene el gen *CoEI* de un aislamiento cubano del VHC (204) que codifica para los primeros 339 aa de la poliproteína viral (pertenecientes a la proteína HCcAg y un fragmento N-terminal de EI), (c) plasmidio pNAO, plasmidio que contiene una unidad de transcripción constituida por el promotor y la región 5' del gen de la enzima Alcohol oxidasa I de *P. pastoris*, el gen codificante para el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg), el terminador del gen de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa de *S. cerevisiae*, el gen *His3* de la levadura *S. cerevisiae* y la región 3' del gen codificante para la enzima alcohol oxidasa I de *P. pastoris* (169), (d) pNAO.Col20, plasmidio en el que se sustituyó el gen codificante para el HBsAg presente en el pNAO por el gen *Col20* que codifica para los primeros 120 aa de la poliproteína viral (Co.120), (e) plasmidio pNAO.Col 76, plasmidio en el que se sustituyó el gen codificante para el HBsAg presente en el pNAO por el gen *Col 76* que codifica para los primeros 176 aa de la poliproteína viral (Co.176), esta proteína incluye la región hidrofóbica que abarca los aa 121-151 y parte de la que abarca los aa 171-191, (f) pNCoEI, plasmidio para la expresión en *E. coli* del gen *CoEI* que codifica para los primeros 339 aa de la poliproteína viral (C- EI), esta proteína incluye las regiones hidrofóbicas que abarcan los aa 121-151 y los aa 171-191, el plasmidio contiene además el promotor *triptófano* (*pTrip*), y el terminador de la transcripción *T4*. (g) pIDKE2 (no mostrado), es un derivado del plasmidio pAEC-K6 (205) que contiene el promotor inmediato temprano del citomegalovirus (CMV) humano, las secuencias de poliadenilación y terminación de la transcripción del SV40, el origen de replicación en bacterias derivado del pUC y un gen para la resistencia a kanamicina como marcador de selección. Este plasmidio permite la expresión de los aa 1-650 de la poliproteína viral, que comprende a las proteínas HCcAg, la EI y la E2 bajo el promotor inmediato temprano del CMV humano (132) y fue utilizado en los ensayos de interacción ADN plasmídico-Co. 120.

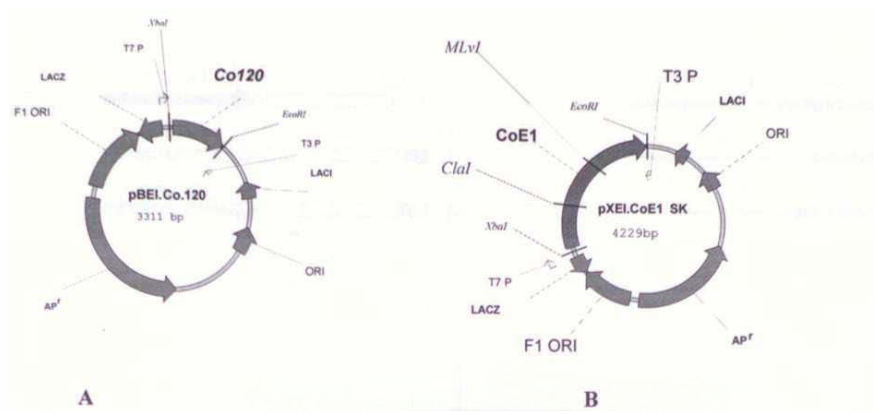


Figura 2. A. Mapa del plasmidio pBEL.Co.120 que contiene el gen *Col20* que codifica para los primeros 120 aa de la poliproteína del VHC. B. pXEL.CoE1.SK plasmidio que contiene el gen *CoE1* que codifica para los primeros 339 aa de la poliproteína del VHC.

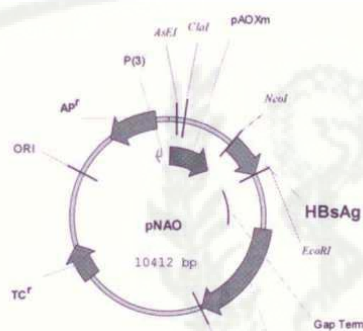


Figura 3. Mapa del plasmidio pNAO de integración-expresión en *P. pastoris*. Se muestran la región del promotor *pAOX1*, el gen que codifica para *tfúsAg*, el terminador de la transcripción *GapT*, y el gen *His3*.

Plasmidios obtenidos en este trabajo: (a) pNAO.CoE1.340 (plasmidio en el que se sustituyó el gen codificante para el HBsAg presente en el pNAO por el gen *CoE1* que codifica para los primeros 339 aa de la poliproteína viral (C-E11), esta proteína incluye las regiones hidrofóbicas que abarcan los aa 121-151 y los aa 171-191), y (b) pSLCo.120, (contiene el gen *Col20* que codifica para los primeros 120aa de la poliproteína viral (Co. 120_e) en el plasmidio pRSET-A (Invitrogen, USA) fusionado al extremo C-terminal de un péptido estabilizante de la expresión y una cola de poli-histidina bajo el control del promotor T7).

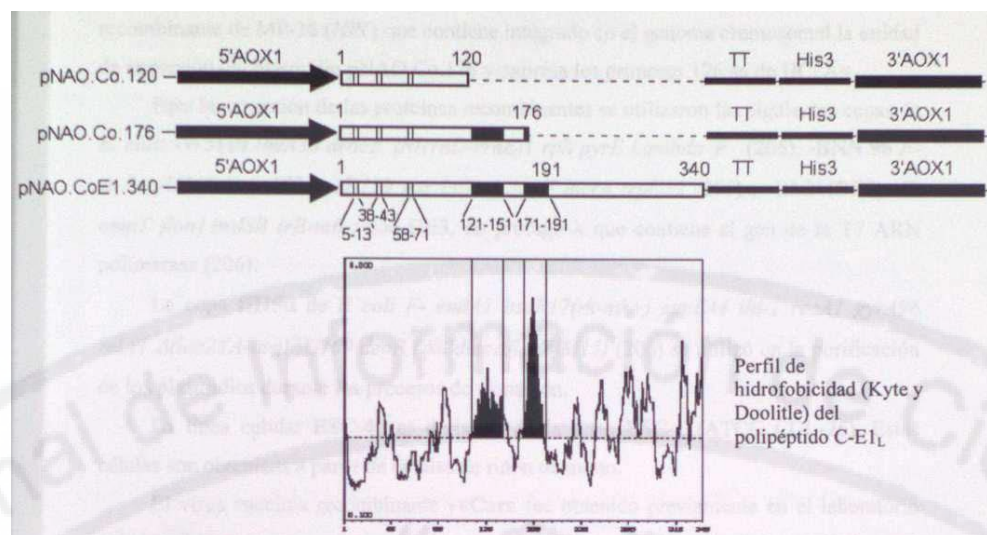


Figura 4. Plasmidios de expresión de los genes *Col20*, *Col76* y *CoE1* utilizados en *P. pastoris*. Se muestran las regiones de homología con el gen *AOX1*, el gen *HIS3'*, y el terminador de la transcripción (TT) *Gapt*. También se muestra el perfil de hidrofobicidad (Kyte and Doolittle) de las regiones heterólogas codificadas en los vectores, las regiones hidrofóbicas de la proteína HCcAg (aa 121-151 y 171-191) y los sitios de localización nuclear (aa 5-13, 38-43 y 58-71).

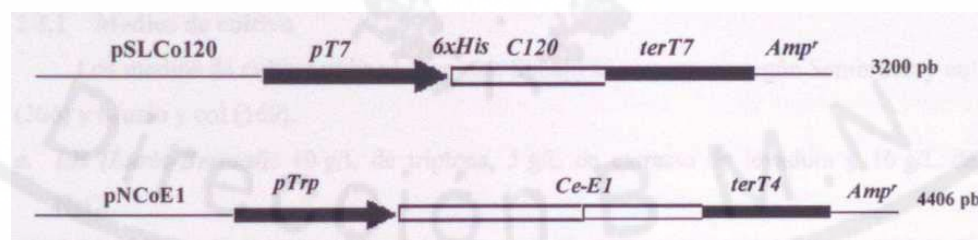


Figura 5. Representación esquemática de los plasmidios de expresión de los genes *Col20* y *CoE1* utilizados en *E. coli*. El plasmidio pSLCo120 expresa el gen *Col20* bajo el control transcripcional del promotor T7. El plasmidio pNCoE1 expresa el gen *CoE1* bajo el control transcripcional del promotor triptofano (*pTrp*).

2.2 Microorganismos, células de organismos superiores y virus recombinante empleados

La cepa de levadura MP-36 (*HIS*) de *P. pastoris* (169) se utilizó como hospedero para la clonación del gen *CoE1*. También se utilizaron las siguientes cepas recombinantes de *P. pastoris* previamente construidas en nuestro laboratorio: C. 120.3, clon recombinante de MP-36 (*HIST*) que contiene integrado en el genoma cromosomal la unidad de expresión del plasmidio pNAO.Co.120 y expresa los primeros 120 aa de HCcAg, 1222: Clon

Resultados

recombinante de MP-36 (*HIS*) que contiene integrado en el genoma cromosomal la unidad de expresión del plasmidio pNAO.Co.176 y expresa los primeros 176 aa de HCcAg

Para la expresión de las proteínas recombinantes se utilizaron las siguientes cepas de *E. coli*: **-W3110** *thvA36 deoc2, IN(rrnD-rrnE)l rph pyrE Lambda "F"* (206), **-BNN 96 F- Δ (lac)U169 Ion- 100 araD139 rps L(Strr) supF mcrA trpC22** (206) , **-BL21(DE3)**: *F- ompT [lon] hsdSB (rB-mB-;* con DE3, un profago *X* que contiene el gen de la T7 ARN polimerasa (206).

La cepa DH5a de *E. coli F- endAl hsdR17(rk-mk+) supE44 thi-1 recAl gyrA96 relAl Δ(lacZYA-argF)U 169 deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15)* (206) se utilizó en la purificación de los plasmidios durante los procesos de clonación.

La línea celular **BSC-40** es derivada de la línea BSC-1 (ATCC CCL-26). Estas células son obtenidas a partir de células de riñón de mono.

El virus vaccinia recombinante **wCore** fue obtenido previamente en el laboratorio (Alvarez-Lajonchere, y *col*; manuscrito en preparación) a partir de la cepa salvaje de virus Vaccinia Western Reserve (WR) (207) y permite la expresión intracelular de los primeros 176 aa de HCcAg.

2.3 Medios de cultivo, enzimas y reactivos 2.3.1 Medios de cultivo

Los medios de cultivo utilizados en este trabajo se prepararon según Sambrook y *col* (206) y Muzio y *col* (169).

- a. **LB (Luria-Bertani)**: 10g/L de triptona, 5 g/L de extracto de levadura y 10g/L de NaCl.
- b. **YPG**: 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona bacteriológica y 20 g/L de glucosa.
- c. **Mínimo YNB-G**: 1,34 % YNB, 4×10^{-5} % biotina y 2 % glucosa.
- d. **Salino**: 22 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5 g/L de K_2HPO_4 , 4,5 g/L de MgSO_4 , 0,5 g/L de CaCl_2 , 10 mL/L de solución de vitaminas, 5 mL/L de solución de elementos trazas y 2% de glicerol.
- e. **Medio de fermentación**: 2,2 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,5 % KH_2PO_4 , 0,45 % $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0,046 % $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,6 % extracto de levadura, 4×10^{-5} % biotina, IX sales trazas, IX vitaminas y 3 % glicerol, pH 5,5.
- f. **YPG 0,5X**: 5 g/L de extracto levadura, 10 g/L de peptona bacteriológica, 10 mL/L de solución vitaminas, 5 mL/L de solución de elementos trazas y 2% de glicerol.

- g. **Solución de elementos trazas:** 0,2 g/L de CuSO_4 , 0,42 g/L de KI, 1,4 g/L de MnSO_4 , 0,96 g/L de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 92,7 g/L de H_3BO_3 , 10 g/L de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 24 g/L de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, concentración final.
- h. **Solución de vitaminas:** piridoxina, tiamina y biotina a 4 mg/L concentración final.
- i. **Triptona soya:** 37 g/L de triptona-soya. El pH se ajustó a 7,3.
- j. Para la preparación de medios sólidos se añadieron 12 gramos de agar por litro de medio para el crecimiento en *E. coli* y 20 gramos de agar por litro de medio para el crecimiento en *P. pastoris*.
- k. **DMEM:** medio Eagle modificado de Dulbecco (Gibco BRL, Grand Island, NY, EEUU).
- l. **DMEM suplementado:** DMEM suplementado con glutamina 2 mM, estreptomicina 100 fig/mL, y penicilina 100 U/mL.
- m. **DMEM 2%:** DMEM suplementado conteniendo 2% de suero fetal bovino (SFB).

2.3.2 Enzimas

Las enzimas de restricción y modificación utilizadas fueron suministradas por New England BioLabs, Inc.(EUA), con excepción de la enzima T7 ADN polimerasa que fue obtenida de USB (EUA). La ribonucleasa de páncreas se obtuvo de Merck (Alemania) y la zimolasa 60 000 de Kirin Brewery Co. Ltd. (Japón).

2.3.3 Reactivos y conjugados

Los reactivos utilizados fueron obtenidos de las firmas Oxoid (Inglaterra), Merck (Alemania) y Sigma (EUA). Los isótopos radiactivos de Amersham-Pharmacia-Biotech (Inglaterra) y el ATP y los desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) de Boehringer Mannheim (Alemania). Los conjugados enzimáticos utilizados en los estudios inmunológicos fueron obtenidos de Sigma (EUA).

2.4 Condiciones de crecimiento de la cepa DH5a

La cepa de *E. coli* DH5a utilizada en las construcciones genéticas (clonación en vectores plasmídicos) se creció en medio LB suplementado con antibióticos (ampicilina a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o kanamicina 100 ng/mL) cuando se requirió. El crecimiento de la cepa de *E. coli* se realizó entre 5 y 12 h a 37°C. El crecimiento de las cepas de expresión se describe posteriormente.

2.5 Péptidos y proteínas

Se emplearon los siguientes péptidos sintéticos, que abarcan diferentes regiones de la proteína HCcAg:

Resultados

A1.5-35, (aa 5-35) PKPQRKTKRNTNRRPQDVKFPGGGQIVGGVY;

A2.51-70, (aa 51-70) KTSERSQPRGRRQPIPKVRR;

A3.110-131, (aa 110-131) TDPRRRSRNLGKVIDTLTCGFA;

Los péptidos se sintetizaron en el Departamento de Síntesis de Péptidos del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) (Ciudad de la Habana, Cuba), de acuerdo al método de síntesis en fase sólida (208) en la resina de 4-methylbenzhidrilamina 1 mmol/g (Fluka, Suiza), usando la estrategia del tert-butiloxicarbonilo/Benzilo. El conjunto resina-péptido se separó con fluoruro de hidrógeno usando el procedimiento "Bajo-Alto" en presencia de los reactivos adecuados y se lavó 3 veces con éter (209). Los péptidos se extrajeron con ácido acético al 30%, se purificaron en cromatografía líquida de fase reversa de alta resolución (Vydac C18, 10x250 mm) y se solubilizaron en PBS a una concentración de 2 mg/mL.

La proteína El.339 que contiene los aa 191-339 de la poliproteína del VHC producida en *E. coli* (210) se utilizó como control en los experimentos de *Western blot* para detectar la proteína El procesada en *P. pastoris*.

Las siguientes proteínas se utilizaron como patrones de peso molecular: Aprotinina (6,5 kb), Lisosima (14 Kb), (3-lactoglobulina (18 Kb), Inhibidor de tripsina (21Kb), Quimotripsinógeno (25 Kb), Anhidrasa carbónica (31 Kb), Albúmina de huevo (45 Kb), Albúmina de suero bovino (66 Kb), Fosforilasa b (97 Kb), p-galactosidasa (116 Kb), Miosina (200 Kb)

2.6 Oligonucleótidos sintéticos

Los oligonucleótidos empleados se sintetizaron en el Departamento de Síntesis de oligonucleótidos del CIGB con el sistema automático 'Gene Assembler Plus DNA synthesizer' (Pharmacia-LKB, Suecia) por el método del p-cianoetilfosforamidito (211). Los siguientes oligonucleótidos quedan incluidos en diferentes regiones del gen *CoEl*, éstos fueron empleados en la clonación de diferentes variantes génicas, así como en su posterior secuenciación.

1965⁺, 26mer Tm=59.9°C 5'-TCATCTAGATGAGCACGAATCCTAAA-3' (*Xba* I), región 5' del gen *Co176*
1966⁺, 30mer Tm=61.7°C 5'-TGAGAATTCTTAGAGAGAGAAAAGCAACC-3' (*EcoR* I), región 3' del gen *Co176*
2161⁺, 29mer Tm=69.0°C 5'-TCAGGATCCATGAGCACGAATCCTAAAACC-3' (*BamH* I), región 5' del gen *Co120*

2162", 32mer Tm=71.0°C 5' -TG AG AATTCTATT A AC[^]CA A ATT A GGG A CT-3'

(*EcoR* I), región 3' del gen *Col20* que codifica los primeros 120 aa

1305', 31mer Tm=75.0°C 5' -GCGGATCCTTGCC ATAGAGGGGCC AAGGC AT-3 gen

Col 76

1025\ 18mer Tm=54.0°C 5*-AGGTCGGTAATTTGGGT-3gen *Col76*

1852% 19mer Tm=58.0°C 5' -GTTT ACCTTCTCGCCTCGC 3', gen *El*

1835⁺, 26mer Tm=60.0°C 5' -GTCACGAACGACTGCTCCA ACTCAAG-3', gen *El*

2064⁺, 29mer Tm=66.0°C 5 * -GT ATCGC AGTT ACTCCGG ATCCC AC A AGC-3', gen *El*

⁺ y significa el sentido de la polimerización que ellos condicionan; NNNNNN indica los sitios de restricción especificados al final, como por ejemplo (*Xba* i); NNN refiere codones de iniciación y terminación y NNNNNN señala regiones de homología, por ejemplo, 1965", 1966', 2161⁺, 1305' y 1025⁺ con el gen *Col 76*.

2.7 Anticuerpos

En los ensayos de inmunoidentificación se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales (AcM) (contra las proteínas HCcAg y El) producidos en el Centro de Ingeniería Genética de Sancti Spíritus: (1) AcM SS-HepC.1 (murino) que reconoce los residuos 5-35 de la proteína HCcAg, (2) AcM SS-HepC.2 (murino) que reconoce los residuos 190-219 de la proteína El. Suero humano 11236: reconoce específicamente a la proteína HCcAg y no reconoce a El en la dilución 1:50 en ensayos de ELISA. También se utilizaron 129 sueros de individuos infectados con el VHC que presentan anticuerpos anti-VHC detectados por un ensayo contra el VHC (UMELISA anti-VHC Tecnosuma International, Habana, Cuba), y 68 sueros de individuos sanos que no presentan anticuerpos anti-VHC (Tecnosuma International, Habana, Cuba) pertenecientes a una seroteca del Departamento de VHC del CIGB.

2.8 Métodos de biología molecular

2.8.1 Técnicas generales de biología molecular

La digestión de ADN con enzimas de restricción, la electroforesis de ADN en geles de agarosa, la recuperación y purificación de ADN fraccionado de geles de agarosa de bajo punto de fusión (LGT), así como la ligazón-de fragmentos de ADN de extremos cohesivos con el uso de ADN ligasa del bacteriófago T4, se realizaron básicamente de acuerdo a los procedimientos descritos por Sambrook y colaboradores (206) y según las recomendaciones de los fabricantes de las diferentes enzimas.

2.8.2 Transformación de bacterias y levaduras

Para la transformación de *E. coli* se prepararon células competentes por el método de

cloruro de calcio según Sambrook y colaboradores (206). La transformación de *P. pastoris* se realizó por electroporación esencialmente según lo descrito por Martínez y colaboradores (212).

2.8.3 Aislamiento de ADN

La purificación de ADN plasmídico de *E. coli* se realizó por el método de lisis alcalina (206). La eliminación del ARN presente en las preparaciones de ADN plasmídico se logró mediante la incubación por una hora a 37°C con ribonucleasa a una concentración de 100 μ g/mL (206).

La extracción de ADN total de levaduras se realizó según el procedimiento descrito por Martínez y colaboradores (212).

2.8.4 Métodos de hibridación

El análisis del ADN genómico por *Southern-blot* se realizó según el método de transferencia por capilaridad descrito por Southern (213) y de acuerdo a las recomendaciones de los fabricantes de las membranas (nylon HYBOND N⁺ de Amershan- Pharmacia-Biotech, Inglaterra o nitrocelulosa de Schleicher and Schüell, Alemania).

Para la preparación de las sondas marcadas con isótopos radioactivos se utilizó la metodología de mareaje por reacción en cadena de la polimerasa (RCP) utilizando cebadores al azar según Sambrook y colaboradores (206). En el caso del mareaje de la sonda para detectar el gen *CoEl* se utilizó como molde el fragmento de gen *Col20* de 360 pb.

2.8.5 Secuencia nucleotídica

Se realizó según el método de secuenciación enzimática de Sanger y colaboradores (214) con las modificaciones descritas por Tabor y Richardson (215). Se usó el juego de reactivos comercial 'Multiwell microtitre plate DNA sequencing system-T7 DNA polymerase' (Amershan-Pharmacia-Biotech, Inglaterra). Las secuencias obtenidas fueron copiladas y analizadas con ayuda del programa de computación Gene Runner 3.02 (Hastings Software Inc., 1994).

2.8.6 Amplificación de ADN *in vitro* mediante la reacción en cadena de la polimerasa

(RCP)

La técnica de RCP se realizó esencialmente según el procedimiento descrito por Saiki y colaboradores (216). La amplificación se realizó a partir de 1 μ g de ADN genómico ó 0,01 ng de ADN plasmídico en una mezcla de reacción de 100 μ L de volumen total que contenía: KCl 0,75 g/L, Iris-HCl 2,42 g/L pH 8,8, (NH₄)₂SO₄ 1,32 g/L, MgSO₄

Resultados

0,2 g/L, Tritón X-100 al 0,1%, cada dNTP a 200 μ M, albúmina bovina 200 μ g/mL, 25 picomoles de ambos oligonucleótidos cebadores y 2 unidades de la enzima Taq- polimerasa. La mezcla de reacción fue recubierta con 50 μ L de parafina líquida para evitar la evaporación.

La amplificación del gen *Col20* se realizó en un programador automático de temperaturas (MiniCycler, MJ Research Inc, EUA), usando un programa de cuatro pasos durante 25 ciclos, del siguiente modo: primer ciclo con 3 min de desnaturalización a 95°C, segundo paso: 0,5 min de desnaturalización a 95°C, 0,5 min de hibridación a 50°C y 1 min de extensión a 72°C (5 ciclos), tercer paso: 0,5 min de desnaturalización a 95°C, 0,5 min de hibridación a 60°C y 1 min de extensión a 72°C (20 ciclos), y un cuarto paso de 5 min de hibridación a 72°C.

Luego de la amplificación, 10 μ L de la mezcla de reacción se analizaron por electroforesis de ADN en geles de agarosa.

2.9 Obtención de la proteína HCcAg en *P. pastoris*

2.9.1 Construcción del plasmidio pNAO.CoEl.340 para la expresión de HCcAg en *P. pastoris*

El plasmidio pXEl.CoEl.SK se trató primero con la enzima *Xba* I y después con la polimerasa Klenow (este tratamiento generó unos extremos romos). Posteriormente, se digirió con la enzima *EcoR* I. El material tratado produce una banda de interés de 1017 pb conteniendo el gen *CoEl*, que codifica para los primeros 339 aa de la poliproteína del VHC. Éste se purificó por electroforesis en gel de agarosa de bajo punto de fusión al 0.8%.

El plasmidio pNAO (**Figura 3**), que contiene el gen *HBsAg*, fue digerido con la enzima de restricción *Neo* I, tratado con la polimerasa Klenow y digerido posteriormente con *EcoR* I. Este tratamiento permite sustituir el gen *HBsAg* por el gen heterólogo proveniente del plasmidio pXEl.CoEl.SK. Todos los segmentos de interés se ligaron con la enzima T4-ADN ligasa y el plasmidio resultante se denominó pNAO.CoEl.340 (**Figura 4**).

En el plasmidio pNAO.CoEl.340, el gen *CoEl* y el empalme del gen *CoEl* con las regiones 5' del promotor AOX1 y el terminador del gen de la enzima gliceraldehído 3- fosfato deshidrogenasa de *S. cerevisiae* fueron confirmados por secuencia con los oligonucleótidos 1965+, 1305-, 1025+,1966-, 1852+, 1835+y 2064+(Anexo 1).

2.10 Transformación en *P. pastoris* y análisis de los transformantes

La transformación de la cepa hospedera MP-36 y el análisis de los transformantes se realizó según un procedimiento descrito por Martínez y col (212). Para la transformación se utilizaron 10 μ g de pNAO.CoEl.340 digerido previamente con las enzimas *Ase I-Sal* I,

Resultados

respectivamente. El producto de la transformación fue crecido en placas de medio mínimo YNB-G (sin histidina), a 28°C por 10 días.

Después de extraer el ADN cromosomal de las colonias crecidas, las muestras se analizaron mediante hibridación de ácidos nucleicos por *Southern-blot*, para evidenciar la integración del fragmento de digestión del plasmidio pNAO.CoEl.340 en el genoma celular. Para el estudio, los ADN cromosomales aislados fueron digeridos con la enzima de restricción *EcoR* I. Se utilizó como sonda el gen *Col20* (obtenido del plasmidio pBEI.Co.120). En las hibridaciones se empleó como control positivo el ADN del plasmidio pNAO.CoEl.340, y el ADN cromosomal del clon 1220 recombinante de *P. pastoris* que contiene integrado el plasmidio pNAO.Col76. Como controles negativos se utilizó el ADN de la cepa hospedera MP-36 y del plasmidio pNAO (que contenía el gen *HBsAg*), digeridos con las mismas enzimas.

En la interpretación de los resultados se realizó previamente un cálculo de las tallas de los fragmentos que deberían obtenerse en la hibridación por *Southern-blot*, de haber ocurrido el evento de integración esperado de remplazamiento génico por integración del fragmento *Ase* \-*Sal* I del plasmidio pNAO.CoEl.340 a nivel del locus AOX1. En la **Figura 6** se representa esquemáticamente el locus AOX1 en la cepa hospedera MP-36, en la cepa recombinante 1222 y el de las cepas obtenidas por recombinación, en el caso de que hubiera ocurrido el evento esperado de recombinación homóloga por remplazamiento con el plasmidio pNAO.CoEl.340. Se muestran las tallas de los fragmentos que se obtienen como resultado de la digestión del ADN de estas cepas con la enzima de restricción *EcoR* I.

2.11 Condiciones de cultivo de las cepas de *P. pastoris* en el fermentador

Los experimentos se realizaron en fermentadores de 5 L (Marubishi, modelo MSJ- U3, Japón), según las condiciones descritas por Morales y col (204). El inóculo se preparó en el medio mínimo YNB-G, partiendo primero de un preinóculo en cultivo de 10 mL durante 24 h con agitación orbital a 30°C, a partir del cual se inoculó un cultivo de 500 mL a una D.O inicial de 0,05. Al cabo de las 24 h se utilizó este cultivo para inocular el fermentador a una D.O inicial de 0,05. Se utilizó un medio establecido por Alvarez y col (Resultados no publicados) (Ver **2.3.1**). Las condiciones de operación fueron: temperatura de 30 °C, agitación a 700 rpm, pH controlado a un valor de 5.5 con hidróxido de amonio al 35% y ácido fosfórico 3 M, y la concentración de oxígeno disuelto se mantuvo por encima de un 10% de saturación.

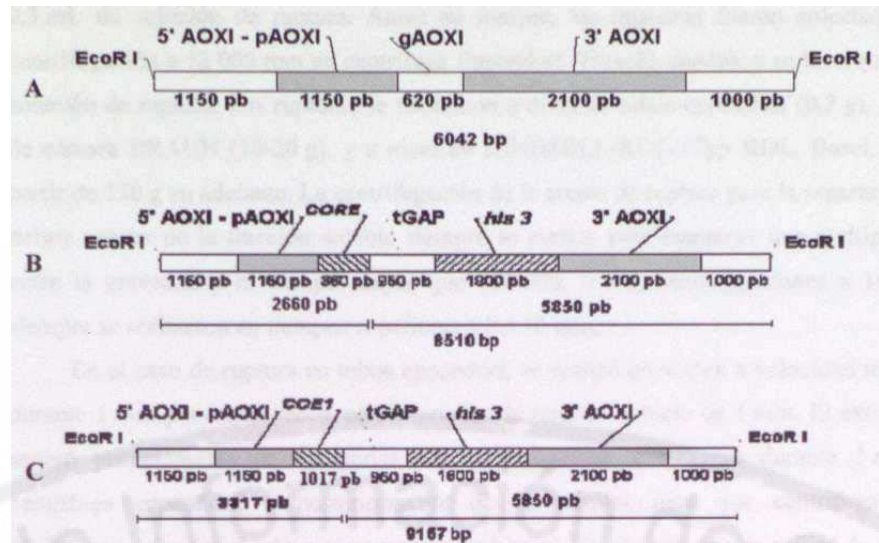


Figura 6. A, Representación del locus AOXI en la cepa MP-36; B y C, Representación del locus AOXI en la cepa recombinante 1222 y en caso de ocurrir el evento de recombinación homóloga por reemplazamiento con el plasmidio pNAO.CoEl .340, respectivamente.

La inducción de la expresión de C-E1L se realizó después de las 12 h. Las concentraciones de metanol en el medio fueron mantenidas con un flujo continuo de 2,5 mL por L de cultivo/hora (12,5 mL/hora para 5 L de cultivo). Se realizaron adiciones periódicas de vitaminas y elementos trazas. El cultivo se creció durante 24 ó 96 h (en dependencia del experimento), para el estudio de la cinética se tomaron muestras cada 3 h, desde el inicio de la fase de inducción de la expresión, al final de la fermentación se colectó toda la biomasa de células restante por centrifugación a 2500 g durante 15 min (Rotor RPR 4-8, Centrifuga Hitachi modelo SCR20BA, Japón).

2.12 Condiciones de ruptura de *P. pastoris*

Para la ruptura celular se utilizaron diferentes tampones y procedimientos, de acuerdo a los volúmenes de biomasa y a los objetivos experimentales que se trazaron. Para el trabajo con la fracción soluble de la proteína C-E1L se utilizó fosfato 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y glicerol 5%, y para los estudios de purificación de la fracción insoluble Tris-HCL 50 mM pH 7.4, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, ditiotritol (DTT) 1mM.

En todos los casos la ruptura se realizó por el principio de cizallamiento con perlas de vidrio de 0,5 mm de diámetro según lo descrito por Morales y col (204), y siempre conservando una proporción de 0,4 g de células (peso húmedo): 0,3 g de perlas de vidrio:

Resultados

0,3 mL de solución de ruptura. Antes de romper, las muestras fueron colectadas por centrifugación a 12 000 rpm en centrífuga Eppendorf (Hitachi, Japón), y se lavaron con la solución de ruptura. Las rupturas se realizaron a nivel de tubos eppendorf (0,2 g), a nivel de cámara BRAUN (10-20 g), y a nivel de DINOMILL-KDL (Typ KDL, Basel, Suiza) partir de 150 g en adelante. La centrifugación de la crema de ruptura para la separación del debris celular de la fracción soluble siempre se realizó para mantener una multiplicidad entre la gravedad y el tiempo mayor que 100 000, o sea, centrifugaciones a 10 000g siempre se realizaron en tiempos superiores a los 10 min.

En el caso de ruptura en tubos eppendorf, se realizó en vortex a velocidad máxima, durante 1 min por cinco veces, con intervalos de reposo en hielo de 1 min. El extracto se separó primeramente de las perlas por centrifugación a 500 rpm durante 1 min en centrífuga eppendorf, y posteriormente de las células rotas por centrifugación a 12 000 rpm, durante 5 min a temperatura ambiente. En el caso que se utilizó la cámara BRAUN se realizaron 3 pases con intervalos de reposo en hielo de 2 min. En el caso de utilización de DINOMILL-KDL se realizaron 5 pases a 4 °C.

2.13 Purificación de la proteína HCcAg derivada de *P. pastoris*

2.13.1 Condiciones de ruptura de *P. pastoris* en homogenizador celular

Para la ruptura se resuspendieron 7 g de biomasa (obtenida por centrifugación del cultivo a 3 000 rpm) en 30 mL de la solución de ruptura descrita previamente. Se utilizó el homogenizador celular MKS (B. Braun, Alemania) con perlas de vidrio de 0,25 a 0,5 mm de diámetro, durante 2 min, tres veces con intervalos de 2 min de descanso en hielo. Las fracciones solubles e insolubles se obtuvieron por centrifugación del extracto a 15 000 rpm (Centrífuga Hitachi modelo SCR 20 BA, Japón), después de diluir el material de ruptura hasta 100 mL con la misma solución de ruptura.

2.13.2 Semipurificación de la proteína HCcAg derivada de *P. pastoris*

Después de la ruptura celular, el material insoluble fue colectado por centrifugación (15 000 rpm) y lavado con Triton X-100 al 1 %/urea 2 M/TE/ DTT 1mM usando el homogenizador Ultra! urrac-Homogenizer (IKA, Germany). La proteína recombinante P21 fue extraída del material insoluble en una solución que contenía urea 8 M en solución citrato-fosfato (ácido cítrico 8 g/L, Na₂HP0₄,7H₂O 2,9 g/L), pH 2,6 a una concentración de 1 mg (peso húmedo)/mL, toda la noche a 4 °C con agitación. Para los estudios de caracterización esta muestra se solubilizó mediante una cromatografía de exclusión molecular utilizando la matriz G-25 (Pharmacia, Suecia) en solución (ácido cítrico 8 g/L, Na₂HP0₄,7H₂O 2,9 g/L) y posteriormente en solución Tris-HCL 50 mM pH 8, NaCl 50 mM,

EDTA 5 mM.

2.13.3 Purificación de la proteína HCcAg derivada de *P. pastoris* por electroelusión

Después de la ruptura, el lavado y la extracción como se describe en los acápites 2.12.1 y 2.12.2, la proteína P21 se centrifugó a 12 000 g por 20 min. Después, la proteína recombinante en solución se precipitó con sulfato de amonio al 40% a 4°C. Posteriormente, la proteína precipitada se solubilizó con una solución de Tris-HCL 50 mM pH 6.8, SDS 2.5%, β-mercaptoetanol 5%, glicerol 10 %, bromofenol azul 0.02 %. La muestra se calentó a 100 °C por 30 min y se centrifugó a 12 000 g for 20 min. La proteína P21 en solución se aplicó en una electroforesis preparativa en SDS-PAGE (BioRad, CA, USA). Después que las proteínas se separaron en el gel, se realizó un procedimiento de tinción negativa del gel por incubación con una solución de imidazol 0.2 M durante 20 min. Posteriormente, se incubó el gel con una solución de sulfato de zinc 0.2 M. Después que las proteínas se hicieron evidentes en el gel, éste se cortó en la zona que se corresponde con la masa molecular de la proteína P21.

La electroelusión de la proteína purificada se realizó en una solución de Tris base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1% en un equipo Bio-Rad por tres horas a temperatura ambiente. La proteína P21 electroeluída (0.5 mg/mL) se solubilizó en el equipo de electroelusión por una hora en una solución de Tris base 25 mM y glicina 192 mM. Además la muestra se dializó en una solución de Tris-HCL 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, DTT 1 mM y glicerol 1%.

2.13.4 Purificación de la proteína HCcAg derivada de *P. pastoris* por cromatografía de intercambio iónico

La ruptura, el lavado y la extracción de la proteína P21 se realizó como se describió en 2.13.1 y 2.13.2. La proteína extraída en solución fue aplicada en una columna de intercambio iónico Fract EMD S03 M (Pharmacia, Suecia). Ésta fue diluida V_i en solución urea 8 M, Tris-HCL 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM, aplicada en la columna (equilibrada con la misma solución) y eluida en un gradiente de cloruro de sodio (NaCl 0- 1 M en la solución de equilibrio). La proteína purificada según **2.13.4** a 0,5 mg/mL en una solución que contenía urea 8M, Tris-HCL 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, EDI A 5 mM, fue dializada contra la siguiente solución: Tris 50 mM, pH 8, NaCl 500 mM, EDI A 1 mM, DTT 1 mM. El proceso de renaturalización se realizó a 4 °C.

2.13.5 Análisis por ultrafiltración de la proteína HCcAg derivada de *P. pastoris*

Las muestras de P21 purificadas de forma desnaturalizada según el procedimiento descrito en 2.13.3 en la solución urea 8M, Tris-HCL pH 8 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA

Resultados

5 mM y solubilizada por el procedimiento descrito en 2.13.3 se utilizaron en este estudio. Para la ultrafiltración se utilizó un sistema AMICOM con capacidad para 300 mL, con una membrana XM 300 con un valor de corte de 300 000 Da y una presión de 1 bar. Se trabajó con las muestras de P21 desnaturalizada y renaturalizada a una concentración de 1 mg/mL. El proceso se repitió tres veces registrándose las concentraciones de proteínas tanto de los concentrados C1, C2 y C3, como de los eluatos PI, P2 y P3.

2.13.6 Análisis por gradientes isopícnicos de sacarosa de la proteína HCcAg derivada de *P.*

***pastoris*. Determinación de la densidad de flotación (ρ)**

Los estudios de centrifugación en gradientes isopícnicos de sacarosa se realizaron según lo reportado por Takahashi y col (217). Los gradientes para el análisis de la densidad de flotación del HCcAg se prepararon básicamente con seis soluciones al 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, y 60% de sacarosa en las mismas soluciones de las muestras analizadas.

En los tubos de centrifuga (1.5 cm de diámetro y 9.6 cm de longitud) con capacidad para 13 mL se dispusieron en el siguiente orden: 5 mL al 60%, 1 mL al 50%, 1 mL al 40%, 1 mL al 30%, 1 mL al 20% y 1 mL al 10% de sacarosa con un flujo controlado mediante una bomba peristáltica. El gradiente se preformó durante 24 horas en reposo a 4 °C. Se aplicó 1 mL de muestra con una concentración de la proteína P21 de 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Las corridas se realizaron en una ultracentrífuga HIMAC (Hitachi, modelo SCP70H) durante 23 horas a 30 000 rpm (160 000 g) utilizando el rotor RPS-40T. El fraccionamiento del gradiente se efectuó desde el fondo del tubo hacia arriba utilizando un capilar acoplado a una bomba peristáltica.

Como control se utilizó el antígeno HBsAg particulado (60 μg) (Lote 02MPABC620, CIGB). En este caso el antígeno se mezcló con un sobrenadante de ruptura de *P. pastoris* (cepa MP-36), o con el buffer donde se encontraba P21. Para las proteínas P21 y HBsAg, las fracciones se analizaron por *Dot-blot*. Se realizó la lectura de la DO a 620 nm con un equipo MultiSkam de los filmes obtenidos del revelado por ECL. La determinación del índice de refracción se realizó utilizando el refractómetro Abbe-3L (Milton Roy). La densidad de flotación asociada a cada fracción se realizó a través de la modelación matemática de los datos tabulados (se utilizó la siguiente fórmula $8,9263 \times \text{IR} - 13,898 \times \text{IR} + 3,6636$, donde IR es el índice de refracción). Los experimentos se realizaron por triplicado.

2.13.7 Análisis de la proteína HCcAg derivada de *P. pastoris* por cromatografía de exclusión

molecular

Se utilizaron las matrices de Sepharose CL-4B y CL-6B (Pharmacia) empacadas en

una columna de 60 cm de largo por 1,6 cm de diámetro, se equilibró con 10 volúmenes de la misma solución de la muestra. Se aplicó 1 mL de la muestra que contiene C-EII, con una concentración de proteína de 1 mg/mL, o el HBsAg (1 mg/mL) a un flujo de 1 mL/min. La muestra fue colectada desde que comenzó a eluir el volumen de exclusión de la matriz. La corrida cromatográfica se realizó utilizando el equipo *BioLogic* de BIORAD.

2.14 Obtención de la proteína HCcAg truncada (Co.120_e) en *E. coli*

2.14.1 Construcción del plasmidio pSLCo120 para la obtención de Co.120_e en *E. coli*

El plasmidio pBEI.Co. 120 se trató con las endonucleasas *Xba* I y *EcoR* I. El fragmento seleccionado de 360 pb se purificó por electroforesis en geles de LGT y se ligó con el plasmidio comercial pRSET-A (Invitrogen, USA) previamente digerido con las enzimas *Xba* I y *EcoR* I. De la ligazón de ambos productos pRSET-A/A'fo I /*EcoR* I y el fragmento del gen *Col20* se obtuvo el plasmidio denominado pSLCo120 (**Figura 5**).

En el plasmidio pSLCo120, el gen *Col20* y el empalme del gen *Col20* con las regiones del plasmidio fueron confirmados por secuencia con los oligonucleótidos 2161⁺, 1305*, 1025⁺ y 2162* (**Anexo 1**).

2.15 Condiciones de cultivo de las cepas de *E. coli*

2.15.1 Condiciones de cultivo en zaranda de la cepa de *E. coli* transformada con el plasmidio pSLCo.120

Para la expresión del gen *Col20* bajo la regulación del promotor T7, se utilizaron las condiciones establecidas para este tipo de sistema (210). Brevemente, se inoculó la cepa recombinante en medio líquido a una DO 620 nm inicial de 0.05 a partir de un cultivo de la cepa BL21(DE3) de *E. coli* transformada con el plasmidio pSLCo120. Las células se crecieron a 37°C. La inducción de la expresión fue realizada con la adición de IPTG (isopropil-B-D-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM. Las células continuaron su crecimiento a la misma temperatura durante 5 horas. Las muestras se centrifugaron a 8000 rpm por 3 min, se lavaron con 1 mL de medio fresco y se resuspendieron en 100 μ l de tampón de muestra de electroforesis con el fin de evaluar la obtención de Co. 120_e mediante SDS-PAGE y *Western blot*.

Para el desarrollo de la cinética de crecimiento se inoculó un cultivo de 300 mL de medio líquido LBA a una DO 620 nm de 0.05 y se creció a 37 °C con agitación en zaranda. Se midió la DO 620 nm cada 2 horas con el objetivo de confeccionar la curva de crecimiento con los valores de DO contra el tiempo de crecimiento.

2.16 Purificación de la proteína Co.120_e derivada de *E. coli*

Las células de *E. coli* BL21(DE3), que expresaban Co.120_e recombinante

Resultados

El material insoluble fue colectado por centrifugación (10 000 rpm) y lavado con Triton X-100 al 1%/urea 2 M/TE utilizando el homogenizador UltraTurrac-Homogenizer (IKA, Germany). Los pasos siguientes de purificación fueron llevados a cabo en un sistema de purificación de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC, Pharmacia, Suecia), con una columna de fase reversa butilo (C4) (Vydac HPLC columns, USA). La proteína Co.120_e recombinante fue extraída en una solución que contenía urea 8 M en solución citrato-fosfato (ácido cítrico 8 g/L, Na₂HP04.7H₂O 2,9 g/L), pH 2,6 a una concentración de 10 mg (peso húmedo)/mL. La proteína extraída fue aplicada en la columna y purificada utilizando el sistema de soluciones H₂O-Acetonitrilo (AcN)/ácido trifluoacético (TFA). Para eluir la proteína se utilizó un gradiente lineal [15-80% AcN:0:60 min.]. La proteína eluída fue liofilizada y guardada a 4°C hasta su posterior uso. La proteína liofilizada fue resuspendida a 1 mg/mL en solución salina (NaCl 0,125 mM) para su solubilización y se mantuvo 1 h en agitación a 4 °C.

2.17 Caracterización de los complejos de ADN plasmídico-Co. 120_e

2.17.1 Preparación de mezclas ADN plasmídico-Co.120_e y su caracterización

Para esto se utilizaron diferentes relaciones (peso:peso) de ADN plasmídico (pIDKE2):Co.120_e recombinante. Se trabajó con una concentración constante de pIDKE2 a 1 mg/mL. Las concentraciones de proteína variaron en dependencia de la relación utilizada. Se trabajó con las relaciones pIDKE2:Co. 120_e de: 10/1, 5/1, 1/1, 1/5 en un volumen final de 500 μ l. Posteriormente, se analizó la presencia de los complejos en geles de agarosa al 0,8%, gradientes isopícnicos de sacarosa y microscopía electrónica.

2.18 Esquemas de inmunización

2.18.1 Inmunización de ratones con las variantes de la proteína HCcAg derivadas de *P. pastoris* y de *E. coli*

Para evaluar la inmunogenicidad de la proteína P21 derivada de *P. pastoris* y de la proteína Co.120_e derivada de *E. coli*, se inmunizaron ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de nacidos con estos antígenos por vía intramuscular. Se incluyó un grupo inmunizado con el placebo PBS. Grupos de 10 ratones fueron inmunizados con dos dosis en 0,1 mL, a las semanas 0 y 3. Los sueros y las células de bazo de los ratones inmunizados fueron colectados 2 semanas después de la última inoculación. Las variantes

Resultados

ensayadas (ver Resultados) fueron:

- I. Grupo 1: Inmunizado con 5 de Co. 120_e en PBS.
- II. Grupo 2: Inmunizado con 5 ng de P21 en PBS.
- III. Grupo 3: Inmunizado con PBS.

2.18.2 Inmunización de ratones con la proteína Co.120_e derivada de *E. coli* para evaluar respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH)

Se inmunizaron ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de nacidos por vía intramuscular.

Grupos de 6 ratones fueron inmunizados con cuatro dosis en 0,1 mL del antígeno en las semanas 0, 3, 7 y 14. A los 21 días de la última inmunización se realizó el ensayo de hipersensibilidad retardada (DTH).

Las variantes ensayadas (ver Resultados) fueron:

- I Grupo 1: Inmunizado con PBS.
- II Grupo 2: Inmunizado con 5 µg de Co.120_e en PBS.
- III Grupo 3: Inmunizado con 50 µg de Co. 120_e en PBS.

2.18.3 Inmunización de ratones con la proteína Co.120_e derivada de *E. coli* en combinación con diferentes adyuvantes

Se inmunizaron ratones BALB/c hembras de 6-8 semanas de nacidos por vía intramuscular.

Grupos de 8 ratones fueron inmunizados con cuatro dosis en 0,1 mL de los antígenos en las semanas 0, 3, 7 y 14. Los sueros de los ratones inmunizados fueron colectados 2 semanas después de la última inoculación.

Se utilizó el adyuvante Montanide ISA 888 (SEPPIC, Paris, Francia). Éste se mezcló en una relación 1:1 con la fase acuosa toda la noche a 4°C. También se utilizó el adyuvante hidróxido de aluminio. Éste se mezcló toda la noche a 4 °C con la proteína (40 µg de hidróxido de aluminio por cada µg de Co.120_e). Las variantes ensayadas (ver Resultados) fueron:

- I Grupo 1: Inmunizado con 5 ng de Co. 120_e en PBS.
- II Grupo 2: Inmunizado con 5 ng de Co.120_e absorbida a hidróxido de aluminio.
- III Grupo 3: Inmunizado con 5 ng de Co.120_e en adyuvante Montanide ISA 888.
- IV Grupo 4: Inmunizado con Montanide ISA 888.

2.19 Métodos analíticos

2.19.1 Determinación de la concentración de proteínas

La concentración de proteínas totales de levadura en los extractos de ruptura se determinó según el método BCA (utilizando el ácido bicínico) (218). En el caso de muestras de mayor pureza la determinación se realizó según la técnica descrita por Lowry

y colaboradores (219).

2.19.2 Microscopía electrónica de transmisión (ME)

Esta técnica se utilizó en la caracterización de las variantes proteicas de HCcAg y de las mezclas pIDKE2-Co.120_c. También se utilizó en la caracterización de la biopsia de hígado de un individuo infectado por el VHC. La técnica se desarrolló según el procedimiento descrito por Falcón y col (220;221). Brevemente, 15 µl de muestra (P21, Co.120_c, ADN plasmídico o mezclas pIDKE2-Co. 120_c) se colocaron sobre las rejillas de cobre (400 mesh), recubiertas de formvar-carbón (evaporador a vacío JEOL-JEE-4X, Japón) previamente desionizadas (JEOL-Ion Sputter JFC-1100, Japón) durante 3 min. Posteriormente, las rejillas se incubaron por 30 s con una solución de acetato de uranilo al 1% y después de lavadas con agua bidestilada estas fueron secadas. Se analizaron un total 1200 PSV provenientes de las diferentes muestras. Por cada muestra se tomaron 3 campos aleatorios por rejillas, realizándose un conteo de 50 PSV por rejillas.

Las muestras fueron visualizadas utilizando la microscopía electrónica de transmisión (ME). La observación se realizó en un microscopio electrónico de transmisión (JEOL 2000 EX, Japón) con aceleración de voltaje de 80 a 100 kV y amplificación entre 50 000 y 100 000 veces.

La muestra de tejido hepático conservada y previamente caracterizada (221) se fijó durante 1 h a 4 °C en una solución de glutaraldehído al 1% (v/v) y paraformaldehído al 4% (v/v), después se trató con la solución de cacodilato de sodio 0.1 M (pH 7.4) y posteriormente se incubó durante 1 h a 4 °C con OsO₄ al 1%. Finalmente, esta muestra se deshidrató con la utilización de etanol. A continuación se obtuvieron secciones ultrafinas (400-500 Å) con un ultramicrotomo (NOVA, LKB), éstas se colocaron en rejillas de cobre (400 mesh). Posteriormente, las rejillas se incubaron por 30 s con una solución de acetato de uranilo al 1% y después de lavadas con agua bidestilada fueron secadas.

2.19.3 Formación de inmunocomplejos (IME)

Para la realización de la IME se empleó el procedimiento clásico descrito para el estudio de partículas asociadas (222) mediante técnicas de tinción negativa sobre rejillas de cobre recubiertas con membranas de formvar-carbón desionizadas. Se prepararon inmunocomplejos mediante la unión, en proporción 1:10, del AcM SS-HepC.1 y una suspensión de la muestra que contiene P21 o Co. 120_c. La mezcla se incubó a 37 °C durante una hora y luego a 4°C durante 24 h para permitir la formación *in vitro* de los inmunocomplejos. Posteriormente estos se concentraron por ultracentrifugación a 28 000 rpm durante una hora a 4 °C, se eliminó el sobrenadante y se procesó el precipitado

de igual forma que para la ME.

2.19.4 Electroforesis de proteínas en SDS-PAGE

Se realizó según la técnica descrita por Laemli (223). Las muestras se prepararon en condiciones de reducción y desnaturalización o no, mediante calentamiento a 100°C durante 20 min en una solución tampón (Tris-HCl 1,21 g/L, EDTA 0,29 g/L, SDS 10 g/L, β-mercapto-etanol 5%, glicerol 20%, pH 8,0).

2.19.5 Tinción con azul Coomassie R-250

La tinción del gel se realizó durante una hora a temperatura ambiente en la solución de tinción (30% de metanol, 10% de ácido acético y 1 g/L de colorante azul Coomassie R 250). Posteriormente, se realizó la destinción en una solución con igual composición que la anterior (excepto en que no contenía colorante), hasta obtener una buena resolución (fondo transparente).

2.19.6 Inmunodetección mediante “immunoblot (*western blot*) - immunodot” (*dot blot*)

Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron del gel de poliacrilamida a filtros de nitrocelulosa de 0,45 fim, según Towbin y colaboradores (224), en una solución tampón (Tris-HCl 2,42 g/L, glicina 11,26 g/L, metanol 20%, pH 8,3). La inmunodetección se realizó según lo reportado anteriormente (210). Brevemente, los filtros fueron bloqueados con 30 g/L de BSA en solución tampón de fosfato (PBS) durante 1 h a 37°C. Después de lavarlos tres veces con PBS, éstos fueron incubados con los anticuerpos específicos para las proteínas del VHC durante 1 h a 37°C. Posteriormente, los filtros se incubaron con los conjugados de proteína A-peroxidasa durante 1 h y la reacción inmunológica se reveló utilizando dos procedimientos, por una parte con amino-etil- carbazole (AEC) en acetato de sodio, como cromógeno. La reacción fue detenida lavando los filtros con agua destilada. En el otro procedimiento se reveló utilizando un sistema de detección basado en luminiscencia (ECL, Amersham, England). En el caso del ‘immunodot’ las muestras se aplicaron directamente sobre los filtros de nitrocelulosa de 0,45 y después de dejarlas secar la inmunodetección se realizó de la misma forma que se describió para el ‘immunoblot’.

2.19.7 Ensayo inmunoenzimático en fase sólida (ELISA)

Los ensayos de ELISA se realizaron según un procedimiento desarrollado previamente (210). Brevemente, las placas de ELISA (Costar, Cambridge, MA) fueron recubiertas con 100 μ l de P21 o Co.120_c (10ng/mL), o péptidos sintéticos (1 μ g/mL)

Resultados

diluidos en solución de recubrimiento (buffer carbonato 50 mM, pH 9.6) a 4°C durante 12 h. Las placas fueron lavadas cuatro veces con PBS conteniendo 0,05% Tween 20 (PBST). Después de bloquear la placa con 3 g/L de BSA en PBST, las diluciones de los sueros ensayados fueron añadidas (utilizando la misma solución de bloqueo) e incubados durante 1 h a 37°C, en las placas previamente recubiertas. Después de lavar las placas, los anticuerpos fueron detectados por la adición de los conjugados correspondientes (Inmunoglobulinas específicas de carnero anti-ratón o anti-humanas conjugadas a peroxidasa) durante 1 h a 37°C. Después de lavar las placas, el sustrato p-fosfato de nitrofenilo (1 mg/mL) en dietanolamina 0,5 M pH 9,8, fue usado para revelar la reacción antígeno-anticuerpo y la absorbancia (DO) fue leída entre 10-30 min a 492 nm. Se tomó como criterio de positividad los valores de DO de las muestras que fueron (dos veces o más) superiores a los valores de DO obtenidos en los controles negativos.

En el experimento de determinación de las subclases de IgG, se incubó con los anticuerpos secundarios anti-IgG1 o una mezcla de anti-IgG2a y anti-IgG2b (diluidos 1: 1000) obtenidos en carnero (Sigma, St Louis, EEUU) durante 1 hora a 37°C. Después se incubó con un conjugado anti-carnero (Sigma, St Louis EEUU) diluido 1:10000 por 1 hora a 37°C. Por último el revelado y la lectura se realizaron como en el procedimiento anterior.

2.19.8 Ensayo de proliferación linfocitaria

La respuesta linfoproliferativa se determinó según lo reportado por De Felice y colaboradores (225). Las células del bazo (esplenocitos), de los ratones inmunizados (n=3), fueron colectadas y diluidas en RPMI 1640 (Gibco, UK), conteniendo estreptomycin (100ng/mL), penicilina (100U/mL) y 2p-mercaptoetanol (50 nM), suplementado con 10% de suero fetal bovino. La densidad celular fue ajustada a 2×10^5 células/pocillos en presencia de 1 ng/mL/pocillo de P21, o de Co.120_e, o de los péptidos P1 (A1), A2 y A3, o una mezcla de ellos (B1), o del HBsAg utilizado como control negativo. Como control mitogénico positivo se utilizó la fitohemaglutinina (PHA al 1%). Además se utilizaron controles celulares que recibieron solamente células. Las células en todos los pocillos fueron cultivadas en 220 μ L de medio. Las placas fueron incubadas en atmósfera húmeda a 37°C y CO₂ 5%, durante 72 h. Las células fueron pulsadas con timidina-tritiada (1 nCi/pocillo MAmersham-Pharmacia-Biotech, UK), durante las últimas 16 h de cultivo y posteriormente cosechadas en filtros (Pharmacia, Suecia). La radioactividad incorporada fue determinada usando un contador líquido de centelleo (1217 Rackbeta, LKB/Wallac, Suecia). Los índices de estimulación (IE) fueron calculados como los conteos por minutos de las células estimuladas dividida por el promedio de los conteos por minuto de los

Resultados

pocillos controles. Se tomó como criterio de positividad del ensayo los valores de IE iguales o superiores a tres. Todas las muestras fueron tratadas por triplicado.

2.19.9 Ensayo de hipersensibilidad retardada (DTH)

El ensayo de DTH se realizó a los 21 días de la última inmunización según el procedimiento reportado por Kundig y col (226). A los 21 días de la última inmunización se realizó la fase de sensibilización. Se inocularon 20 µg de Co.120_c en la pata trasera derecha de los ratones. Como control negativo se inocularon 20 ng de HBsAg en la pata trasera izquierda de los ratones. A las 48 h de la sensibilización se realizó la medición del diámetro de las patas con un Caliper (Caliper, Mitutoyo, Japón). Las mediciones se realizaron por triplicado. La evaluación de los datos se realizó midiendo la diferencia entre el diámetro medido en la pata derecha y el diámetro de la pata izquierda de cada ratón. Los valores obtenidos fueron analizados como se describe en los procesamientos estadísticos.

2.20 Reto con virus vaccinia recombinante

Se retaron cinco animales de cada grupo con 10⁶ unidades formadoras de placa (ufp) del vvCore por cada ratón por vía intraperitoneal. El reto se aplicó en un volumen final de 200 µl en PBS, 7 días después de la última dosis de la inmunización.

2.20.1 Titulación de virus Vaccinia a partir de los ovarios extraídos de los ratones

La titulación del virus se realizó según lo descrito por Kundig y col (226). Brevemente, los ratones se sacrificaron cinco días después de la inoculación viral. Se extrajeron ambos ovarios y se maceraron vigorosamente en medio DMEM suplementado, quedando en un volumen final de 2 mL. Después se procedió a dar tres pases sucesivos de congelación-descongelación a la muestra y se realizó un tratamiento de ultrasonido a 40 Amplitudes durante 30 s. La muestra tratada se centrifugó a 25 000 rpm durante 10 min y el sobrenadante se utilizó en los pasos siguientes. Primeramente, se hicieron los ensayos con una mezcla de los sobrenadantes de todos los ratones del grupo. Posteriormente, en el grupo donde se apareció una disminución del título viral (Grupo 3) y en el grupo control negativo (Grupo 4) se realizó el estudio a los sobrenadantes de los ratones individuales. Los sobrenadantes virales fueron diluidos en medio DMEM suplementado. Después se adicionó 0,5 mL de cada dilución, por duplicado, sobre placas previamente cultivadas con células BSC-40. Se dejó adsorber el medio con el virus por 1 h a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%. Después se retiró ese medio y se añadió 3 mL de medio DMEM 2 % SFB. Después las placas se incubaron 48 horas en las mismas condiciones. Pasado este tiempo se retiró el medio y se añadió 1 mL de violeta cristal al 1% en metanol (p/v). Se dejó actuar

Resultados

el colorante durante 10 min. Luego se lavaron las placas con agua corriente y se secaron a 25 °C. Por último, se contaron las placas de lisis, el título se expresó como el logaritmo de las ufp/mL.

2.21 Análisis estadísticos

A los datos obtenidos se les comprobó la normalidad por la prueba de Kolmogorov- Smirnov y la homogeneidad de varianza por la prueba de Bartlett cuando se analizaron más de dos grupos o la prueba F cuando se analizaron dos grupos. Si cumplían las anteriores premisas se empleó el análisis de varianza de clasificación simple y para comparar las medias entre todos los grupos, la prueba *t* de Bonferroni. Cuando se realizó la comparación entre las medias de dos grupos se utilizó la prueba *t* de Student (227;228). El procesamiento estadístico se realizó utilizando el programa “GraphPad Prism”.



3 RESULTADOS

3.1 Obtención de la proteína HCcAg en la levadura *P. pastoris*

3.1.1 Clonación del gen codificante para la proteína HCcAg

El plasmidio de expresión pNAO.CoEl.340 se obtuvo según la metodología descrita en Materiales y Métodos (Figura 4). Este plasmidio contiene, entre los sitios de restricción *Ase* I y *Sal* I, una unidad de integración constituida por los siguientes elementos:

- Posee en sus extremos regiones de homología con el locus AOXI de la levadura *P. pastoris*, necesarias para que ocurra el evento de integración por recombinación homóloga en el locus del gen AOXI (5'AOXI y 3'AOXI).
- Promotor del gen de la enzima alcohol oxidasa I de *P. pastoris* (pAOXI).
Gen que codifica para los primeros 339 aa de un aislamiento cubano del VHC. Terminador del gen de la enzima gliceraldehído 3' fosfato deshidrogenasa de *S. cerevisiae* (tGAP).
Gen *His3* de la levadura *S. cerevisiae* como marcador de selección.
- El fragmento restante que corresponde al plasmidio pUC19.

La integridad del gen heterólogo y del empalme con las regiones 5' del promotor AOXI y el terminador del gen de la enzima gliceraldehído 3' fosfato deshidrogenasa de *S. cerevisiae* fue confirmada por secuencia, no encontrándose cambios en la secuencia esperada (Anexo).

3.1.2 Obtención de cepas recombinantes de *P. pastoris*

El sistema de transformación utilizado se basó en la selección de colonias por auxotrofia al aminoácido histidina, con el empleo del plasmidio de expresión pNAO.CoEl.340 que portaba el gen *His3* de *S. cerevisiae*.

En la placa control (cepa MP-36 sin plasmidio) no hubo crecimiento de colonias. En la Figura 7 se muestran los resultados experimentales obtenidos de la digestión *EcoR* I en el análisis del ADN de 11 colonias estudiadas para los recombinantes transformados con el plasmidio pNAO.CoEl.340. Como control de integración se utilizó el clon 1222 que se corresponde con un transformante de *P. pastoris* obtenido con el plasmidio pNAO.Co. 176 (Figura 4) que presenta un evento de integración de recombinación homóloga por remplazamiento génico a nivel del locus AOXI.

En los recombinantes obtenidos con el plasmidio pNAO.CoEl.340 (Figura 7) se observa por *Southern blot* de la digestión *EcoR* I que uno de ellos (clon 15) hibrida con un peso molecular de aproximadamente 3 kb y un poco superior al control 1222 (Figura 7 Derecha, Línea 3). Este valor se corresponde con la talla calculada de haber ocurrido el

Resultados

evento de integración esperado (recombinación homóloga por remplazamiento génico) (**Figura 6**). En las líneas 1 (control negativo), 4 y 8 no ocurrió hibridación. En el resto de las colonias se observó una hibridación a una altura aproximada entre 5 y 6,5 kb. Del total de 11 colonias analizadas 1 mostró el patrón de integración esperado (denominado clon CoEl. 15), similar al clon 1222, y las otras que resultaron positivas presentaron un patrón similar que el plasmidio pNAO.CoEl.340 (digerido *Sae I*/ *MSal I*) utilizado en la transformación. Estos resultados fueron verificados mediante la repetición de los análisis.

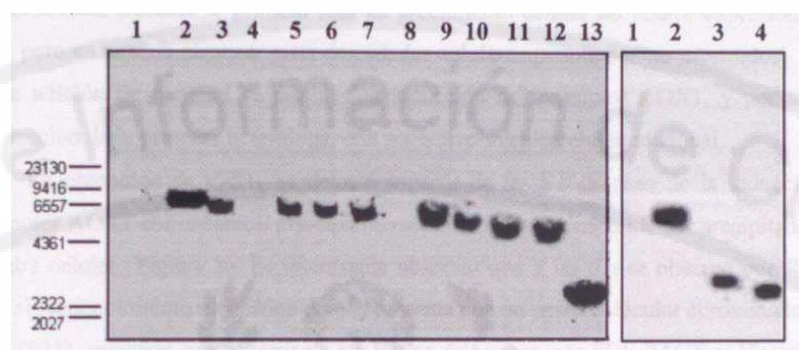


Figura 7. Resultados de la hibridación por **Southern-blot**. **Izquierda:** Digestión **EcoR I**, sonda gen **Col20**. Líneas: 1. ADN pNAO (control negativo, *P. pastoris* portando el gen codificante para el HBsAg), 2. ADN pNAO.CoEl.340 digerido **Ase I/Sal I**, 3-12. ADN de 10 colonias analizadas, 13. ADN pNAO.Co.176 (control positivo, clon 1222 de *P. pastoris* portando el gen codificante para Co.176). **Derecha:** Digestión **EcoR I**, sonda gen **Col20**. Líneas 1. ADN pNAO (control negativo, *P. pastoris* portando el gen codificante para el HBsAg), 2. ADN pNAO.CoEl .340 digerido **Ase I/Sal I**, 3. ADN del clon 15, 4. ADN pNAO.Co.176 (Control positivo, clon 1222 de *P. pastoris* portando el gen codificante para Co.176). A la izquierda se observan los tamaños del Patrón de peso molecular ADN >-Hind III.

3.1.3 Síntesis de la proteína HCcAg en *P. pastoris*

Para el estudio de la expresión del gen codificante para los primeros 339 aa de la poliproteína viral, que contempla la región codificante para la proteína HCcAg y el fragmento N-terminal de la proteína de la envoltura El (C-E1), se escogió el clon CoEl. 15. Este mostró un patrón de integración de recombinación homóloga por remplazamiento génico cuando se analizó por experimentos de *Shouthern blot* (Figuras 6 y 7).

Con este clon se realizaron estudios de seguimiento de la expresión de la proteína C-E1 en el tiempo en fermentadores de 5 L de volumen de cultivo, con el objetivo de evaluar la síntesis de C-E1_L en condiciones controladas de temperatura, agitación, aireación y pH. En la Figura 8 se muestran los resultados de la expresión del clon CoEl. 15 en medio

Resultados

salino, con el empleo de las condiciones de operación descritas en Materiales y Métodos. La expresión de C-E11 se detectó por SDS-PAGE y *Western blot*, utilizando el AcM SS- HepC'.1 como anticuerpo primario. En estos experimentos se utilizó como control negativo la cepa hospedera MP-36.

Se realizó una fermentación en dos pasos, ya que el cultivo se inoculó utilizando glicerol como fuente de carbono. Posteriormente, cuando el glicerol se consume totalmente, se realiza la adición de metanol, la que se mantiene durante el resto de la fermentación. Durante la primera fase de crecimiento celular no ocurre expresión de C-E1L, pero es posible alcanzar altas densidades celulares (resultados no mostrados). Luego de la adición de metanol se produce la inducción del promotor AOXI, y por tanto la producción de la proteína heteróloga, con poco crecimiento celular adicional.

La obtención de C-E11 se detectó a partir de las 6 h después de la inducción del promotor AOXI con metanol, principalmente en la fracción insoluble del precipitado de la ruptura celular (**Figura 8**). Es interesante observar que a las 6 h se observó por *Western blot* el reconocimiento específico de una proteína con un peso molecular aproximado de 21 kDa (P21), mientras que a partir de las 9 h se detectaron por SDS-PAGE y *Western blot* dos proteínas con pesos moleculares aproximados de 21 kDa (P21) y 23 kDa (P23) que no se observaron en el control negativo (**Figura 8**). Tomando en consideración las dos proteínas detectadas, los niveles de expresión alcanzados a las 24 h después de la inducción estuvieron en un rango entre el 4-5% de las proteínas en el precipitado de ruptura celular de levadura (determinado utilizando el programa Quantity-One, Bio-Rad Laboratories, USA). La expresión de C-E1L se mantuvo en niveles similares hasta las 96 h (resultados no mostrados). No se observó en estos estudios el reconocimiento de una proteína con un peso molecular de 37 kDa correspondiente al producto íntegro de C-E11 (P37). Esto indica que la expresión del producto C-E1L en *P. pastoris* va acompañada de un procesamiento de la poliproteína. Estos resultados permitieron afirmar que el clon recombinante evaluado fue capaz de expresar la proteína C-E11 y que el sistema hospedero-vector utilizado resultó adecuado para promover la síntesis de este antígeno por esta levadura.

3.1.4 Procesamiento de la proteína HCcAg producida en *P. pastoris*

Para estudiar el posible procesamiento de esta proteína se emplearon los clones Col20.3, 1222 y CoE1.15. Los dos primeros se utilizaron como controles y expresan variantes truncadas de la proteína HCcAg que abarcan los primeros 120aa y 176aa, respectivamente. Los estudios se hicieron en fermentadores de 5 L de volumen de cultivo

se tomaron muestras a las 24 h después de la inducción.

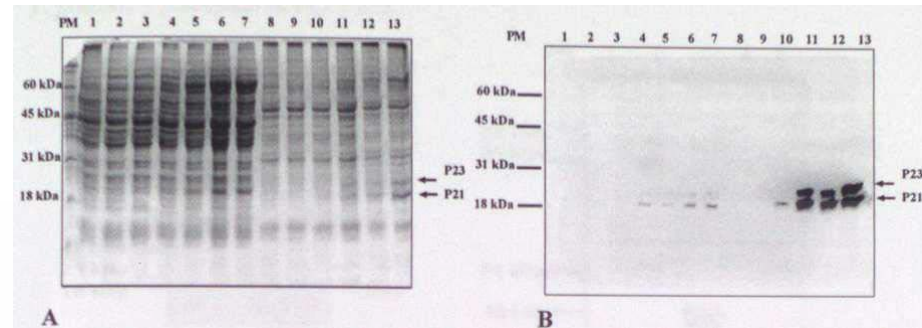


Figura 8. Estudio de la obtención de la proteína C-E1_L a partir del clon Co.El. 15 en fermentador de 5 L. A. SDS-PAGE y B. *Western blot* de las muestras tomadas durante la fermentación, Líneas: 1. Proteínas totales de la ruptura de MP-36 a las 6 h después de la inducción, 2-7. Proteínas en la fracción soluble del precipitado de ruptura celular provenientes de: clon Co.El.15 a las 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h y 24 h después de la inducción, respectivamente. 8-13. Proteínas en la fracción insoluble del precipitado de ruptura celular provenientes de: clon Co.El.15 a las 0 h, 3 h, 6 h, 9 h, 12 h y 24 h después de la inducción, respectivamente. Este experimento se realizó por triplicado. **PM:** Marcador de peso molecular, se señala a la izquierda. Las flechas indican la posición de P21 y P23. Se utilizó el AcM SS-HepC.1 como anticuerpo primario.

Todas las variantes sintetizadas (Co.120L, Co.176L y C-E1L) de la proteína HCcAg fueron inmunodetectadas por un suero de un individuo infectado con el VHC (que reconoce específicamente a la proteína HCcAg pero no a la proteína El) (**Figura 9A**). En este estudio comparativo se pudo definir que la proteína P21 producto de la síntesis de C- E1L, presenta un peso molecular similar al que presenta la molécula de 176 aa (C.176L) (**Figura 9A y B**) (note que el polipéptido P21 producido por el clon CoEl. 15 es similar en peso molecular a la proteína Co.l 76L producida por el clon 1222).

Las proteínas Co.176_l, P21 y P23 son reconocidas además por el AcM SS-HepC.1 que reconoce un epítopo entre el aa 5 y 35 de la proteína HCcAg (**Figuras 9B arriba**). Por otra parte si tiene lugar el procesamiento de la poliproteína C-E1L, la proteína El debe ser detectada como un polipéptido de 16 kDa. Como se muestra en la **Figura 9**, la proteína El se detectó con un peso molecular superior al esperado (32 kDa en vez de 16 kDa) utilizando el AcM SS-HepC.2 (**Figura 9B abajo**).

La integridad funcional del gen *CoEl* se comprobó estudiando la expresión en *E. coli*. Se utilizó la cepa W3110 transformada con el plasmidio pNCoEl que porta el gen *CoEl* bajo el control transcripcional del promotor triptófano (*litrip*) (**Figura 5**). El estudio por *Western blot* evidenció el reconocimiento específico de la proteína recombinante C -E1_e con la talla esperada de 37 kDa (P37) (**Figura 10**). En esta figura también se muestra una

Resultados

comparación del producto C-EI_e producido en *E. coli* con el producto C-EI_L producido en *P. pastoris* y procesado en P21 y P23.

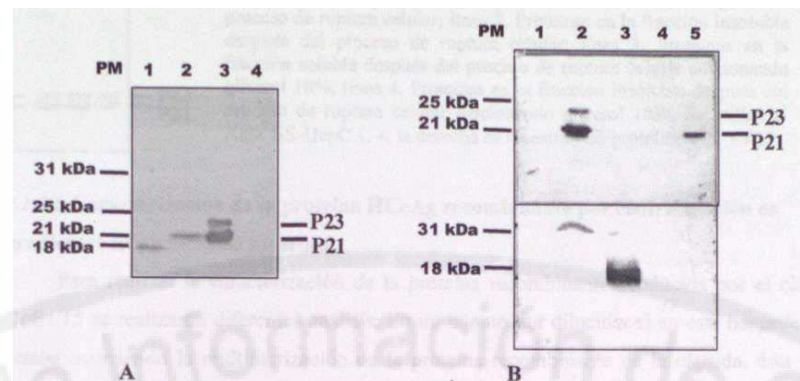


Figura 9. Procesamiento de la proteína C-EI_L en *P. pastoris*. **A. Western blot.** Líneas 1. Lisado de células enteras clon C. 120.3 que expresa la proteína C.120_L; 2. Lisado de células enteras clon 1222 que expresa la proteína Co.176, 3. Lisado de células enteras clon C-E 1.15 que expresa la proteína C-EI_L. 4. Lisado de células enteras cepa MP36. Se utilizó el suero humano 11236, **B. Western blot.** Líneas 1. Lisado de células enteras clon C-E 1.15 antes de inducir; 2. Lisado de células enteras clon C-E 1.15 después de inducir, 3. Proteína El.339, 4. Lisado de células enteras clon 1222 antes de inducir; 5. Lisado de células enteras clon 1222 después de inducir. Arriba se utilizó el AcM SS- HepC.1 anti-HCcAg. Abajo se utilizó el AcM HepC.2 anti-El. (Patrones de PM utilizados: B- lactoglobulina; Inhibidor de tripsina; Quimotripsinogeno; Anhidrasa carbónica)

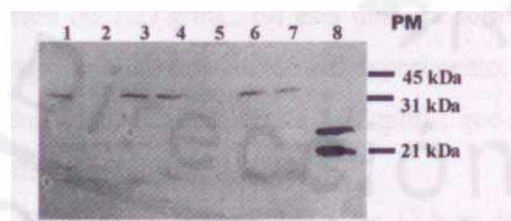


Figura 10. Comparación del procesamiento de C-EI_L y C-EI_e en *P. pastoris* y en *E. coli*, respectivamente. **Western blot** utilizando el AcM SS-HepC.1 Líneas 1, 3, 4, 6 y 7: proteínas de las colonias de la cepa W3110 transformada con el plasmidio pNCoEl, Líneas 2 y 5: proteínas de la cepa W3110 sin transformar; Línea 8: proteínas del clon C-E 1.15 de *P. pastoris* PM: Patrón de peso molecular: Inhibidor de tripsina; Anhidrasa carbónica; Albúmina de huevo.

3.1.5 Caracterización de la proteína HCcAg obtenida en la fracción soluble de la ruptura de *P.*

pastoris

De los primeros estudios de la expresión de C-EI_L se pudo extraer como primeros resultados que las formas P21 y P23 se obtienen fundamentalmente asociadas al precipitado de ruptura celular en la solución Tris-HCL 50 mM pH 7.4, NaCl 50 mM, EDTA 5 mM (**Figura 11**). Para aumentar la proporción de éstas proteínas en la solución después de la ruptura, se adicionó glicerol 10% a la solución de ruptura (**Figura 11**).

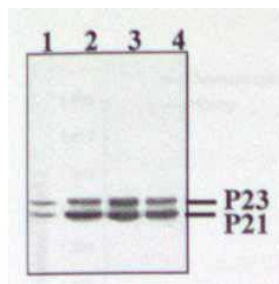


Figura 11. Solubilización parcial de P21 y P23 con glicerol. *Hústern blot*. Línea 1. Proteínas en la fracción soluble después del proceso de ruptura celular; línea 2. Proteínas en la fracción insoluble después del proceso de ruptura celular; línea 3. Proteínas en la fracción soluble después del proceso de ruptura celular adicionando glicerol 10%, línea 4. Proteínas en la fracción insoluble después del proceso de ruptura celular adicionando glicerol 10%. Se utilizó el AcM SS-HepC.1. A la derecha se muestran las proteínas P21 y P23.

3.1.5.1 Caracterización de la proteína HCcAg recombinante por centrifugación en gradientes isopícnicos de sacarosa

Para realizar la caracterización de la proteína recombinante producida por el clon CoEl. 15 se realizaron diferentes análisis. En un intento por dilucidar si en este hospedero estaba ocurriendo la multimerización de la proteína recombinante de la cápsida, ésta se estudió primeramente en experimentos de centrifugación en gradientes isopícnicos de sacarosa. La evaluación se realizó a la proteína recombinante obtenida en la fracción soluble a las 6 h, 12 h y 24 h después de la inducción, y al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HBsAg) particulado utilizado como control.

Como se muestra en la **Figura 12**, a las 6 h después de la inducción de la expresión del gen *CoEl*, la proteína de la cápsida migró en estos experimentos con una densidad de flotación de 1.27 g/mL. En esta muestra sólo se detectó P21 (**Figura 12A**). Se utilizó el HBsAg como control interno del experimento. El HBsAg mostró, en nuestras condiciones, una densidad de flotación de 1.22 g/mL, que es similar a la informada por otros autores (resultado no mostrado) (229).

En la muestra analizada a las 12 h se detectaron dos poblaciones que contienen C-E1L con densidades de flotación de 1,20 g/mL y 1,27 g/mL (**Figura 12B**). La mayor proporción de C-E1L se encontró en la fracción de 1,27 g/mL, que es similar a la observada a las 6 h y esta compuesta exclusivamente por P21. Resultó interesante que en la fracción de 1,20 g/mL se detectaron P21 y P23 (**Figura 12B**).

En la muestra analizada a las 24 h, también se detectaron dos poblaciones que contienen C-E1L con densidades de flotación 1,20 g/mL y 1,27 g/mL (**Figura 12C**). No obstante, en esta muestra la mayor proporción de C-E1L (70%) se encontró en la fracción de 1,20 g/mL. Nuevamente se detectaron en esta fracción P21 y P23. Al igual que en las muestras evaluadas a las 6 y 12 h, P21 fue la proteína detectada en la fracción de 1,27 g/mL a las 24 h (**Figura 13C**).

Resultados

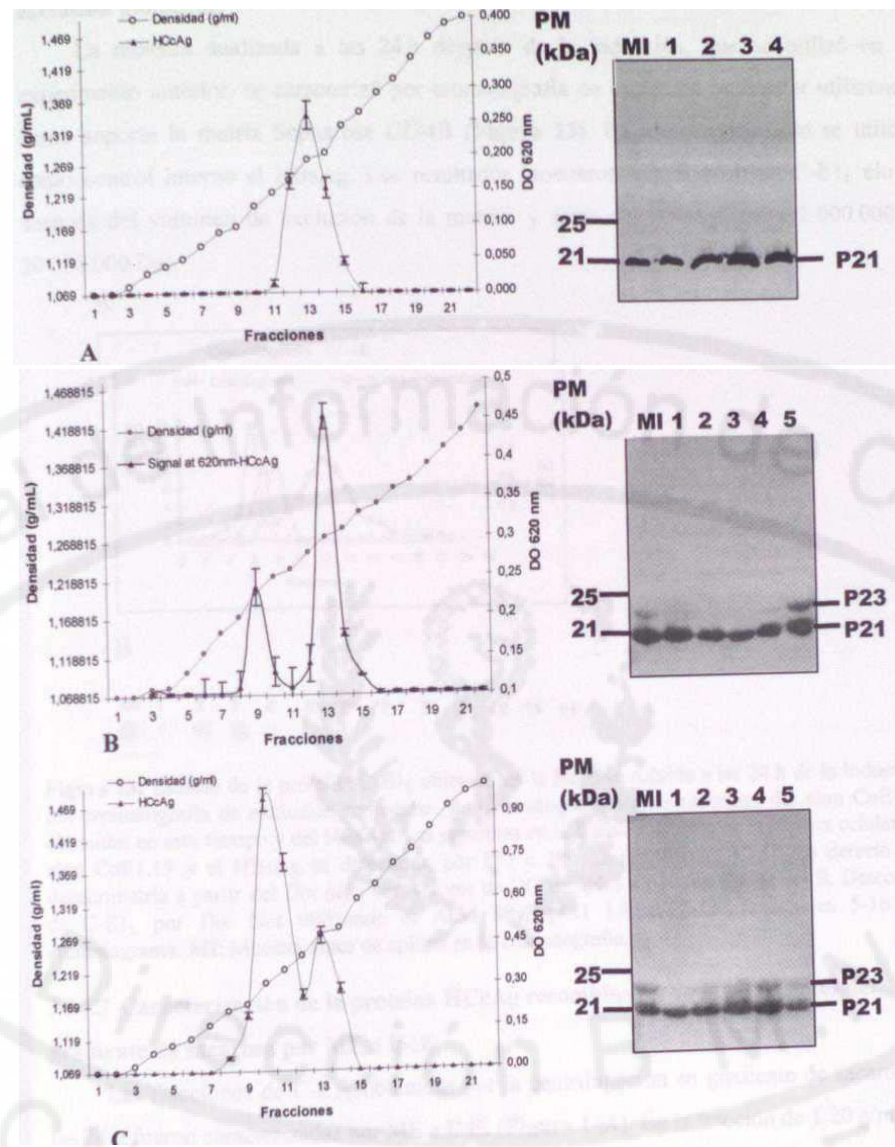


Figura 12. Gradientes isopícnicos de sacarosa de las muestras que contienen C-E11 procesada en la fracción soluble de la ruptura celular analizada en diferentes tiempos de la inducción (Izquierda). Se muestra la detección de C-E1_L (DO 620 nm) y la densidad de las fracciones (g/mL). Derecha: Análisis por *Western blot* de las fracciones con C-E1_L. A. Muestra obtenida a las 6 h, Líneas: MI, 1, 2, 3 y 4: muestra inicial, fracciones 15, 14, 13, y 12 respectivamente; B. Muestra obtenida a las 12 h, Líneas: MI, 1, 2, 3, 4 y 5: muestra inicial, fracciones 11, 12, 11, 10 y 9 respectivamente. C. Muestra obtenida a las 24 h, Líneas: MI, 1, 2, 3, 4 y 5: muestra inicial, fracciones 13, 12, 11, 10 y 9 respectivamente. Se aplicó 1 ng de C-E1_L y se utilizó el AcM SS-HepC. 1. Este experimento se realizó por triplicado.

3.1.5.2 Caracterización de la proteína HCcAg recombinante por cromatografía de exclusión molecular

La muestra analizada a las 24 h después de la inducción, que se utilizó en el experimento anterior, se caracterizó por cromatografía de exclusión molecular utilizando como soporte la matriz Sepharose CL-4B (**Figura 13**). En este experimento se utilizó como control interno el HBsAg. Los resultados mostraron que la proteína C-E1L eluye después del volumen de exclusión de la matriz y antes del HBsAg (entre 2 000 000 y 20 000 000 Da).

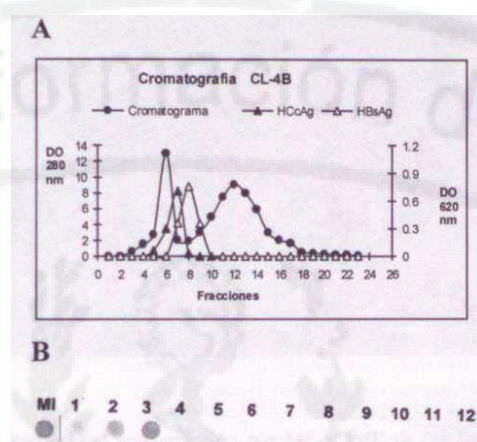


Figura 13. Estudio de la proteína C-E1₁ obtenida en la fracción soluble a las 24 h de la inducción por cromatografía de exclusión molecular. **A.** Cromatograma de las proteínas del clon CoE1.15 obtenidas en este tiempo y del HBsAg. Las proteínas en la fracción soluble de la ruptura celular del clon CoE1.15 y el HBsAg se detectaron por DO a 280 nm (Izquierda). C-E1₁ se detectó por densitometría a partir del *Dot blot*, con valores de DO medidos a 620 nm (Derecha) **B.** Detección de C-E1₁ por *Dot blot* utilizando el AcM SS-HepC.1 Líneas **1-12:** Fracciones 5-16 del cromatograma. **MI:** Muestra antes de aplicar en la cromatografía.

3.1.5.3 Caracterización de la proteína HCcAg recombinante en las fracciones del gradiente de sacarosa por ME e IME

Las fracciones de C-E1L obtenidas por la centrifugación en gradiente de sacarosa a las 24 h fueron caracterizadas por ME e IME (**Figura 14A**). En la fracción de 1.20 g/mL se observaron agregados proteicos y no partículas esféricas (**Figura 14B**). Por otro lado, en la fracción de 1.27 g/mL se observaron partículas esféricas con un diámetro entre 25 y 35 nm que fueron reconocidas por el AcM SS-HepC.1 (**Figura 14C**). Éstas partículas de P21 son similares en tamaño y forma a las partículas semejantes a nucleocápsidas encontradas en los hepatocitos de pacientes infectados con el VHC que presentan un diámetro entre 20 y 40 nm (**Figura 14D**) (220).

Resultados

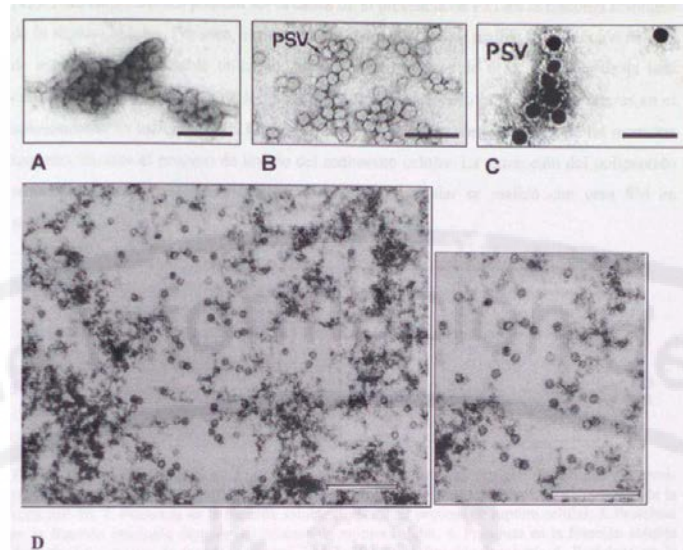


Figura 14. Caracterización por ME y IME de las fracciones del gradiente de sacarosa con densidades de flotación de 1,20 y 1,27 g/mL provenientes de la muestra analizada 24 h después de inducir la expresión de C-E1_L. **A.** Análisis por ME de la fracción de densidad 1,20 g/mL. **B,C.** Análisis por ME e IME, respectivamente de la fracción de densidad 1,27 g/mL. **D.** Análisis por ME de las partículas semejantes a nucleocápsidas presentes en hepatocitos de pacientes infectados con el VHC. PO: Partículas de oro coloidal. Barra: 200 nm en **A, B** y **C**, 250 nm en **D**.

3.1.6 Semi-purificación de la proteína HCcAg (P21) extraída de la fracción insoluble de la ruptura celular

Después de analizar la muestra de la fracción soluble de ruptura celular que contiene P21 y P23, se decidió purificar la proteína P21 con la finalidad de estudiar su capacidad de autoensamblarse *in vitro*. El predominio mayoritario de P21 asociada al material insoluble después de la ruptura celular (**Figura 8**), condicionó el inicio de la purificación mediante lavados sucesivos a partir de esta muestra. Se trabajó con la muestra obtenida a las 24 h después de la inducción. La proteína P21 contiene las regiones hidrofóbicas descritas en el extremo C-terminal de HCcAg que interaccionan con las membranas celulares (**Figura 4**)

Resultados

(43). Esta característica pudiera ser la causa de la presencia de P21 en la fracción insoluble de la ruptura celular. Por esto, como primera aproximación se realizó la extracción de P21 de esta fracción insoluble utilizando altas concentraciones de urea. Después de la lisis celular y lavados sucesivos de la fracción insoluble, se obtuvo la proteína de interés en el sobrenadante de extracción. La Figura 15 muestra el patrón electroforético de las muestras tomadas durante el proceso de lavado del sedimento celular. La extracción del polipéptido recombinante del material insoluble de la ruptura celular se realizó con urea 8M en solución Tris 50 mM, pH 8.

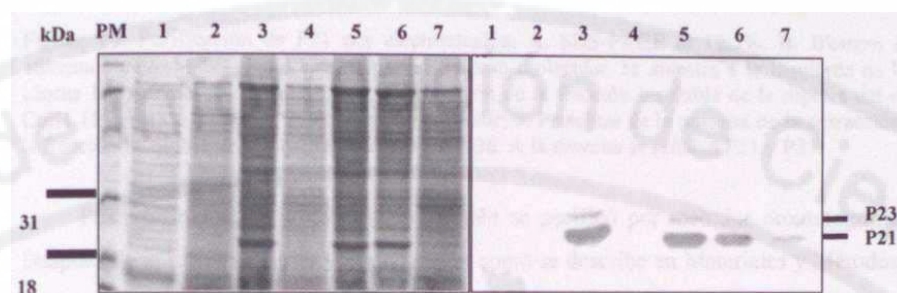


Figura 15. A. SDS-PAGE al 12,5 % de las muestras tomadas durante el proceso de semi-purificación de la proteína C-E1_L. B. *Western blot* utilizando el AcM SS-HepC.1, 1. Proteínas de la cepa MP-36, 2. Proteínas en la fracción soluble después del proceso de ruptura celular, 3. Proteínas en la fracción insoluble después del proceso de ruptura celular, 4. Proteínas en la fracción soluble después del proceso de lavado con urea 2M/TxlOO de la fracción insoluble 5. Proteínas en la fracción insoluble después del lavado con urea 2M/TxlOO, 6. Proteínas en la fracción soluble después del proceso de extracción con urea 8 M, 7. Proteínas en la fracción insoluble después del proceso de extracción con urea 8 M. Los patrones de peso molecular están indicados en kDa a la izquierda. P21 y P23 están indicadas a la derecha.

3.1.7 Purificación de P21

Con el objetivo de estudiar la capacidad de P21 de autoensamblarse *in vitro*, se trabajó con la muestra obtenida en urea 8M, como se describió en 3.1.2.4.1. Esta proteína se purificó en estas condiciones por diferentes métodos. Se describen su purificación por electroelución y métodos cromatográficos. La proteína P21 se mantuvo en condiciones desnaturalizantes desde su extracción para lograr su purificación como un polipéptido de 21 kDa y de evitar la interacción de estos polipéptidos entre sí, así como disminuir su interacción con otras moléculas. Primeramente, la mezcla de proteínas se aplicó en una electroforesis de SDS-PAGE desnaturalizante preparativa con el objetivo de purificar P21. Los resultados de la purificación después de eluir del gel la proteína de interés por electroforesis se muestran en la Figura 16.

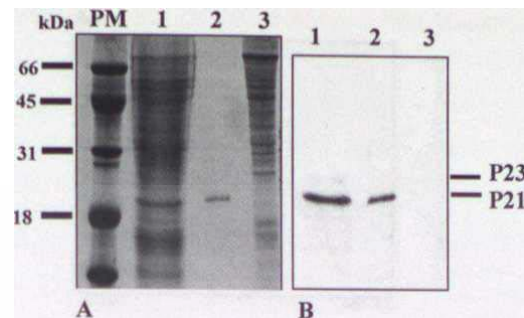


Figura 16. Purificación de P21 por electroelusión. **A.** SDS-PAGE al 12,5%. **B.** *Western blot* utilizando el AcM SS-HepC.I. **PM:** patrón de peso molecular, se muestra a la izquierda en kDa. Líneas 1. Proteínas de la muestra de la extracción de la fracción insoluble de la ruptura del clon CoEl. 15 antes de purificar; 2. P21 después de eluir; 3. Proteínas de la muestra de la extracción de la fracción insoluble de la ruptura de la cepa MP-36. A la derecha se señalan P21 y P23.

Posteriormente, la proteína P21 también se purificó por métodos cromatográficos. Después de la ruptura celular y la extracción como se describe en Materiales y Métodos, la proteína recombinante se obtuvo en una solución que contenía urea 8 M, Tris-HCL 50 mM pH 8, NaCl 50 mM, y EDTA 5 mM. En este caso la proteína P21 también se mantuvo en condiciones desnaturalizantes desde la extracción y durante todo el proceso de purificación. Teniendo en cuenta el punto isoeléctrico (pI) calculado para P21 (12,5) se decidió utilizar una cromatografía de intercambio catiónico para pegar la proteína a la matriz. La mezcla de proteínas fue aplicada en una matriz de Fractogel-EMD S03 M. Un cromatograma tipo de estas cromatografías se muestra en la **Figura 17A**. En la **Figura 17B** y C se muestran los resultados del proceso de purificación, después de la cromatografía de intercambio iónico. Como producto de este proceso se obtuvieron fracciones con más de un 80% de pureza (**Figura 17B, Línea 7**). Estas fracciones están constituidas por P21.

3.1.8 Caracterización de la proteína P21 purificada

3.1.8.1 Solubilización de la proteína P21 purificada

En la muestra de P21 purificada por electroelusión se disminuyó la presencia del agente desnaturalizante como se describe en Materiales y Métodos. Por otro lado en busca de una mayor recuperación de moléculas P21 solubles purificadas por métodos cromatográficos, se analizó la siguiente consideración al experimento. Se determinó iniciar el proceso de eliminación del agente desnaturalizante (urea) diluyendo el mismo hasta concentraciones menos efectivas, y sólo entonces dializar contra el tampón sin el agente desnaturalizante como se describe en Materiales y Métodos.

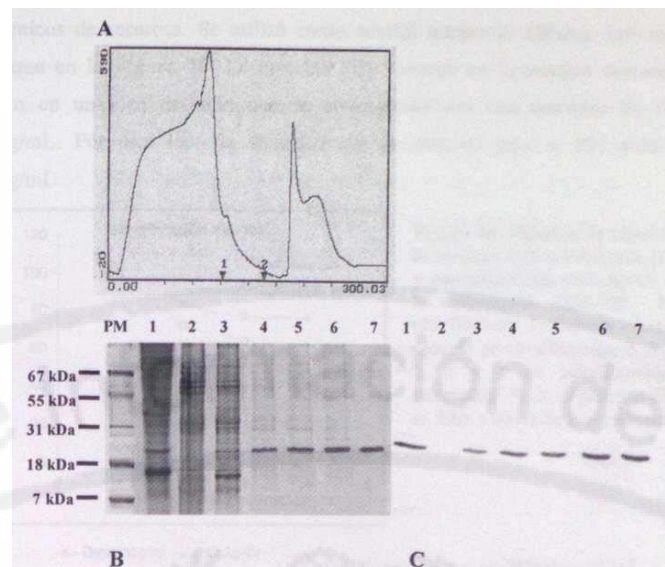


Figura 17. Purificación de P21 por intercambio iónico. **A.** Cromatografía de intercambio iónico sobre Fractogel-EMD S03 M de la muestra de extracción. **B y C.** SDS-PAGE y *Western blot*, respectivamente, de las muestras después del proceso de purificación. **PM.** Patrón de peso molecular de proteínas. Líneas: 1. Proteínas extraídas con urea (Muestra inicial) 2. Proteínas que no interaccionaron con la matriz 3-7. Fracciones del gradiente de elución con NaCl.

3.1.8.2 Caracterización del ensamblaje de P21 *in vitro*

La proteína P21 purificada por los diferentes procedimientos mostró propiedades similares en los estudios de caracterización. A continuación se muestran los resultados obtenidos con la proteína purificada por electroelusión.

3.1.8.3 Estudios de ultrafiltración

El estado de multimerización de la proteína recombinante purificada fue estudiado primeramente en experimentos de ultrafiltración utilizando una membrana con un valor de corte de 300 000 Da. Se estudiaron las muestras de P21 en condiciones desnaturizantes y después de la solubilización. Los resultados se muestran en la **Figura 18**. Como se aprecia en el gráfico, la fracción mayoritaria (60%) de P21 desnaturizada se filtró a través de la membrana. Este resultado contrastó con el obtenido con la muestra de P21 solubilizada, donde la fracción mayoritaria (80%) no se filtró a través de la membrana.

3.1.8.4 Caracterización de P21 por centrifugación en gradientes isopícnicos de sacarosa

La proteína purificada se caracterizó adicionalmente por centrifugación en gradientes

Resultados

isopíenicos de sacarosa. Se utilizó como control interno el HBsAg. Los resultados se muestran en la Figura 19. La proteína P21 presente en la muestra desnaturalizada se obtuvo en un pico definido que se corresponde con una densidad de flotación de 1,10 g/mL. Por otro lado la densidad que se observó para la P21 solubilizada fue

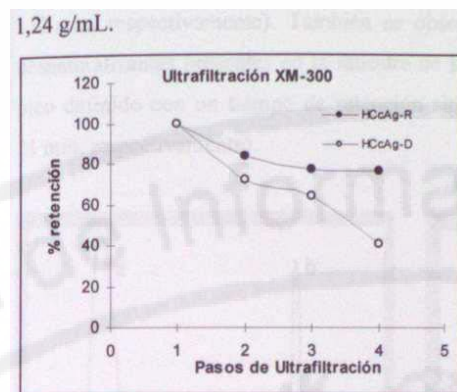


Figura 18. Estudios de ultrafiltración de la proteína P21 solubilizada (HCCAg-R) y desnaturalizada (HCCAg-D) utilizando la membrana XM-300. Pasos de ultrafiltración Muestra inicial antes del proceso de ultrafiltración; 2, 3 y 4: Pasos 1, 2 y 3 de ultrafiltración. % de retención: % de la proteína P21 que no se filtra a través de la membrana.

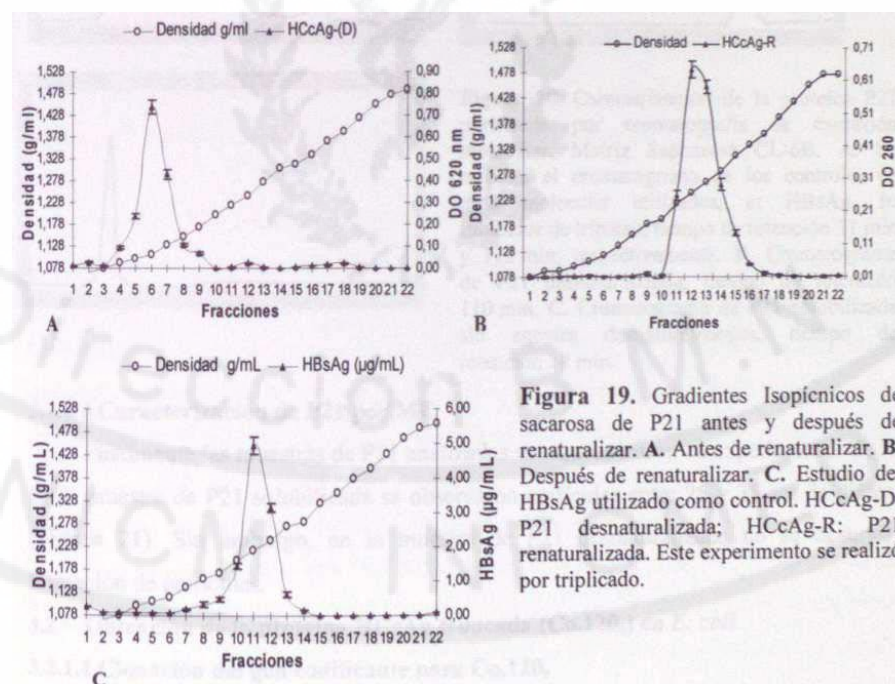


Figura 19. Gradientes Isopíenicos de sacarosa de P21 antes y después de renaturalizar. A. Antes de renaturalizar. B. Después de renaturalizar. C. Estudio del HBsAg utilizado como control. HCCAg-D: P21 desnaturalizada; HCCAg-R: P21 renaturalizada. Este experimento se realizó por triplicado.

3.1.8.5 Caracterización de P21 por cromatografía de exclusión molecular

Posteriormente la muestra de P21 purificada en presencia de agentes desnaturalizantes y la muestra de P21 solubilizada sin agentes desnaturalizantes (Ver Materiales y Métodos) se caracterizaron por cromatografía de exclusión molecular

Resultados

utilizando como soporte una matriz de Sepharose CL-6B. Se utilizaron como controles de peso molecular la proteína inhibidor de tripsina (21 kDa) y el HBsAg (>1500 kDa) (**Figura 20**). Este experimento confirmó que P21 fue purificada como un monómero con un tiempo de retención similar al observado para la proteína control inhibidor de tripsina (110 min y 112 min, respectivamente). También se observó que después de disminuir los agentes desnaturalizantes presentes en la muestra de la proteína P21 purificada, ésta migró en un pico definido con un tiempo de retención similar al obtenido para el HBsAg (28 min y 31 min, respectivamente).

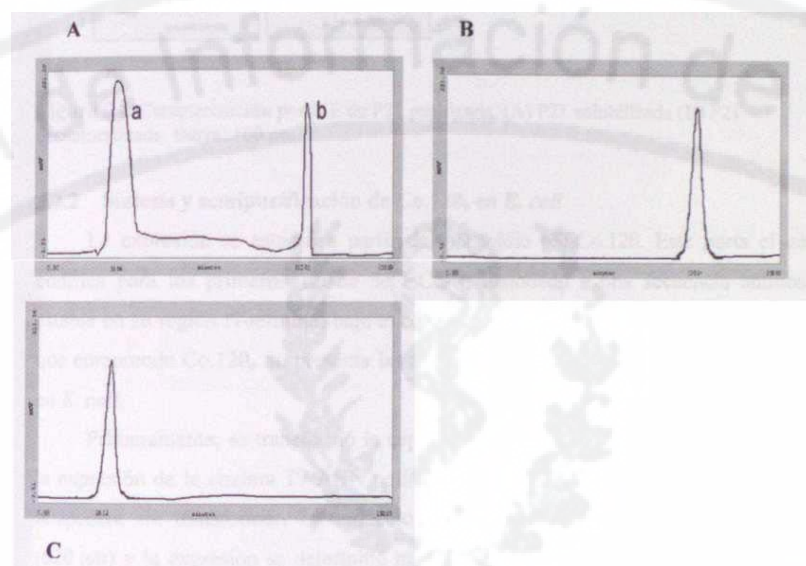


Figura 20. Caracterización de la proteína P21 purificada por cromatografía de exclusión molecular. Matriz Sepharose CL-6B. **A.** Se muestra el cromatograma de los controles de peso molecular utilizados, **a:** HBsAg, **b:** Inhibidor de tripsina, tiempo de retención 31 min y 112 min, respectivamente. **B.** Cromatograma de P21 desnaturalizada, tiempo de retención 110 min. **C.** Cromatograma de P21 solubilizada sin agentes desnaturalizantes, tiempo de retención 28 min.

3.1.8.6 Caracterización de P21 por ME

Finalmente las muestras de P21 analizadas se caracterizaron en experimentos de ME. En la muestra de P21 solubilizada se observaron partículas entre 25 y 35 nm de diámetro (**Figura 21**). Sin embargo, en la muestra de P21 desnaturalizada no se observó la formación de partículas.

3.2 Obtención de la proteína HCcAg truncada (Co.120_e) en *E. coli*

Clonación del gen codificante para Co.120_e

Según la estrategia diseñada (descrita en Materiales y Métodos), se obtuvo el plasmidio de expresión pSLCo. 120 (**Figura 5**). Este contiene los siguientes elementos:

- Promotor del gen T7 del bacteriófago T7 (pT7).
- Gen que codifica para la proteína Co. 120

Terminador del gen T4.

Gen de resistencia de ampicilina/ μ m// como marcador de selección.

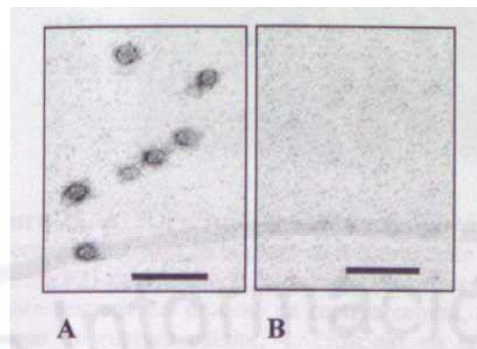


Figura 21. Caracterización por ME de P21 purificada. (A) P21 solubilizada (B) P21 desnaturalizada. Barra: 100 nm.

3.2.2 Síntesis y semipurificación de Co.120_e en *E. coli*

La expresión se estudió a partir del plasmidio pSLCo.120. Este porta el gen que codifica para los primeros 120 aa de HCcAg fusionado a una secuencia aminoacídica estable en su región N-terminal bajo el control transcripcional del promotor T7. La región que comprende Co.120_e no presenta las zonas hidrófobas que pueden afectar su síntesis en *E. coli*.

Primeramente, se transformó la cepa BL21(DE3) que presenta el profago DE3 para la expresión de la enzima T7 ARN polimerasa. Se utilizó como control negativo la cepa hospedera sin transformar. La inducción se realizó cuando el cultivo alcanzó 0.7 DO (620 nm) y la expresión se determinó mediante SDS-PAGE y *Western blot* (Figura 22). Aunque la proteína recombinante tiene un peso molecular teórico de 18 kDa, esta migró con un peso molecular de 21 kDa. Los niveles de expresión estuvieron en un rango entre el 10-15% del total de proteínas en la fracción insoluble de la ruptura celular de *E. coli* (determinado utilizando el programa Quantity-One, Bio-Rad Laboratories, USA).

El predominio mayoritario del producto recombinante asociado al material insoluble después de la ruptura celular, condicionó el inicio de la semipurificación mediante lavados sucesivos a partir de esta muestra. En la Figura 22 se muestra el proceso de lavado y extracción de la proteína Co.120_e. Para extraer el polipéptido recombinante de los cuerpos de inclusión se utilizaron altas concentraciones de urea (urea 8 M, en solución tampón citrato-fosfato 20 mM, pH 2,6).

Resultados

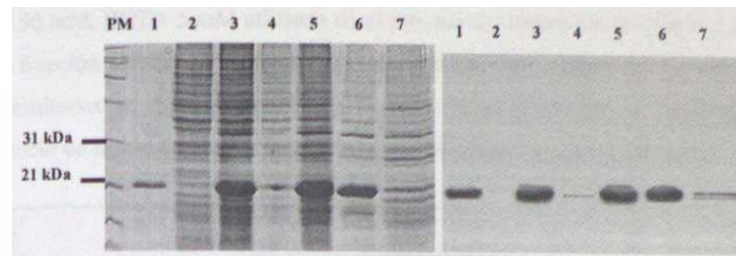


Figura 22. A. SDS-PAGE al 12,5% y **B.** *Western blot* de las muestras tomadas durante el proceso de semi-purificación de la proteína recombinante Co.120_e. PM Patrón de peso molecular. Líneas: 1. Proteína P21 purificada de *P. pastoris* (utilizada como control positivo), 2. Proteínas en la fracción soluble después del proceso de ruptura celular, 3. Proteínas en la fracción insoluble después del proceso de ruptura celular, 4. Proteínas en la fracción soluble después del lavado con urea 2M/TX100, 5. Proteínas en la fracción insoluble después del proceso de lavado con urea 2M/TX100, 6. Proteínas en la fracción soluble después de la extracción con urea 8 M/TE, 7. Proteínas en la fracción insoluble después de la extracción con urea 8 M/TE. Los patrones de peso molecular están indicados a la izquierda.

También se realizó un análisis de la localización celular del producto recombinante. La proteína Co. 120_e se estudió por SDS-PAGE en las fracciones solubles e insolubles de la ruptura de los clones inducidos a diferentes valores de DO. Se observó que a medida que la inducción se realizó en estadios más avanzados de crecimiento celular, la proteína Co.120_e se asoció al material insoluble (Figura 23).



Figura 23. Distribución de la proteína Co.120_e en las fracciones soluble e insoluble después de la ruptura celular. A. SDS-PAGE. Línea 1: control positivo (células totales), Líneas 2, 4, 6 y 8: Fracción soluble del clon inducido a 0.3 DO, 0.5 DO, 0.7 DO y 0.9 DO respectivamente. Líneas 3, 5, 7 y 9: Fracción insoluble del clon inducido a 0.3 DO, 0.5 DO, 0.7 DO y 0.9 DO, respectivamente. La proteína se encuentra mayoritariamente en la fracción insoluble.

3.2.3 Caracterización de la proteína Co.120_e obtenida en la fracción soluble 3.2.3.1

Caracterización de Co.120_e mediante IME

Para realizar la caracterización preliminar de la proteína Co.120_e presente en la fracción soluble de la ruptura celular, se indujo la expresión de la proteína recombinante entre 0.3 y 0.5 de DO a 620 nm del cultivo celular de la cepa transformada. Posteriormente, se adicionó glicerol al 5% a la solución tampón Iris-HCL 50 mM pH 7.4,

Resultados

NaCl 50 mM, EDI A 5 mM utilizada en el proceso de ruptura celular. La muestra obtenida en la fracción soluble se caracterizó por estudios de IME utilizando el AcM SS-HepC.1, los resultados se muestran en la Figura 24. Se observó que el anticuerpo utilizado reconoció de forma específica la presencia de partículas con un diámetro entre 20-40 nm.

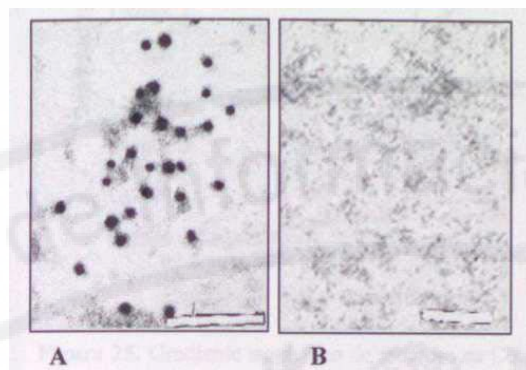


Figure 24. Análisis por IME del sobrenadante de ruptura celular utilizando el AcM SS-HepC.1. **A.** Muestra proveniente de la cepa BL21(DE3-) transformada con el plasmidio pSLCo.120, **B.** Muestra proveniente de la cepa BL21(DE3-) sin transformar. Se observa el mareaje de Co.120_e con partículas de oro coloidal. Las partículas tienen un tamaño entre 20 y 40 nm de diámetro. Barra 250 nm

3.2.3.2 Caracterización de Co.120_e mediante centrifugación en gradientes de sacarosa

La proteína Co.120_e presente en la fracción soluble fue estudiada en experimentos de centrifugación en gradientes isopícnicos de sacarosa. Se utilizó como control interno el HBsAg. Los resultados se muestran en la **Figura 25**. La proteína Co.120_e se obtuvo en un pico definido que se corresponde con una densidad de flotación de 1,28 g/mL. Este valor es similar al observado para las partículas de P21 obtenidas en *P. pastoris* (1,27 g/mL).

3.2.4 Caracterización de Co.120_e obtenida a partir de la fracción insoluble

Posteriormente, con la finalidad de realizar una caracterización preliminar de la proteína Co.120_e obtenida de la fracción insoluble, ésta se solubilizó como se describe en Materiales y Métodos en solución tampón Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 8 utilizando una cromatografía de exclusión molecular. Mediante este procedimiento se eliminó el agente desnaturante (urea). La caracterización por IME demostró la presencia de partículas entre 20 y 40 nm de diámetro que fueron reconocidas específicamente por el AcM SS- HepC.1 en la muestra de Co. 120_e solubilizada (**Figura 26**). Note que las partículas detectadas son similares a las obtenidas en la fracción soluble de la ruptura celular.

Resultados

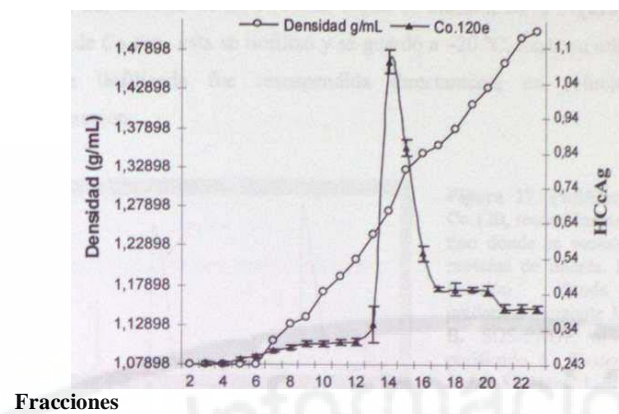


Figura 25. Gradiente isopícnico de sacarosa de Co.120_e presente en la fracción soluble. Los valores de Co.120_e fueron medidos por densitometría del *Dot blot* a DO 620 nm (Derecha). Este experimento se realizó por triplicado.

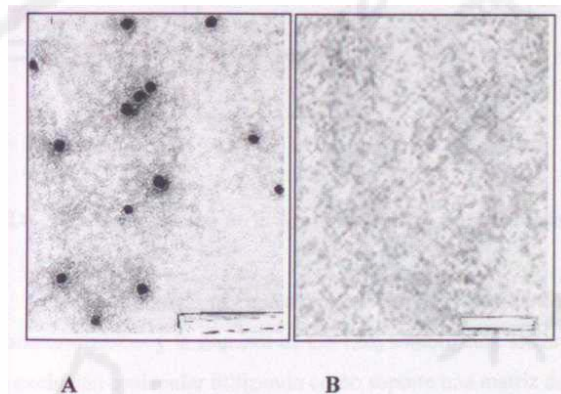


Figure 26. Análisis por IME de Co.120_e semipurificada y solubilizada. A, Co.120_e semipurificada y solubilizada B. proteínas de la cepa BL21 sin transformar con el mismo procesamiento de la muestra A. Se observa el mareaje de Co.120_e con partículas de oro coloidal. Se utilizó el AcM SS- HepC. 1. Las partículas tienen un tamaño promedio entre 20-40 nm. Barra 250 nm.

3.2.5 Purificación y solubilización de la proteína Co.120_e

Después de filtrar la muestra obtenida en el proceso de semipurificación a través de un filtro de 0,2 μ m, el extracto fue aplicado en una columna de fase reversa RP-C4. En esta cromatografía, la proteína de interés fue separada de los contaminantes de *E. coli* manteniendo las condiciones desnaturizantes que permitieron su purificación como un monómero. Un cromatograma tipo de este proceso se muestra en la Figura 27A. La proteína Co.120_e se obtuvo con una pureza entre 90-95%, determinada por densitometría

Resultados

después del análisis en SDS-PAGE, según se muestra en la Figura 27B. Después de la elusión de Co.120_e, esta se liofilizó y se guardó a -20 °C, hasta su utilización posterior. La proteína liofilizada fue resuspendida directamente en solución salina para su solubilización.

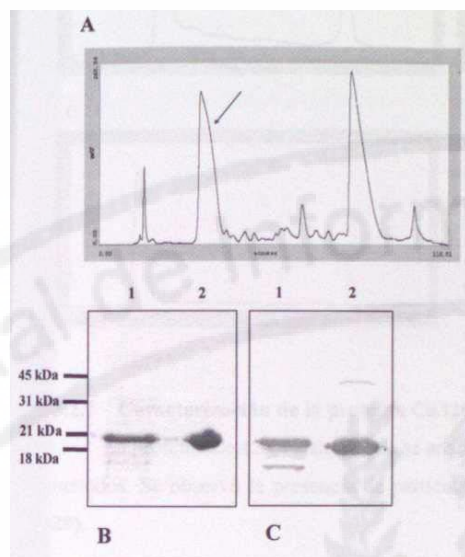


Figura 27. Purificación de la proteína Co.120_e recombinante. A. Cromatograma tipo donde se muestra la elusión de la proteína de interés. La flecha señala la fracción donde se detectó predominantemente la proteína Co.120_e. B. SDS-PAGE al 15% de Co.120_e purificado. C. Western blot utilizando el AcM SS-HepC.1. Líneas 1. Proteína recombinante Co.120_e después del procedimiento de lavado del precipitado celular y extracción. 2. Fracción principal de la elusión de Co.120_e de la cromatografía. A la izquierda se muestra el patrón de peso molecular.

3.2.6 Caracterización de la proteína Co.120_e por cromatografía de exclusión molecular

Posteriormente, la muestra de Co.120_e purificada en presencia de agentes desnaturizantes y la muestra de Co. 120_e solubilizada se caracterizaron por cromatografía de exclusión molecular utilizando como soporte una matriz de Sepharose CL-6B.

Se utilizaron como controles de peso molecular la proteína inhibidor de tripsina (21 kDa) y el HBsAg (>1500 kDa) (Figura 28). Este experimento indicó que la proteína Co. 120_e fue purificada como un monómero con un tiempo de retención ligeramente menor que la proteína inhibidor de tripsina (116 min y 113 min, respectivamente). También se observó que después de solubilizar la protema Co. 120_e purificada sin la presencia del agente desnaturizante, esta migró en un pico definido con un tiempo de retención similar al obtenido para el HBsAg (29 min y 32 min, respectivamente).

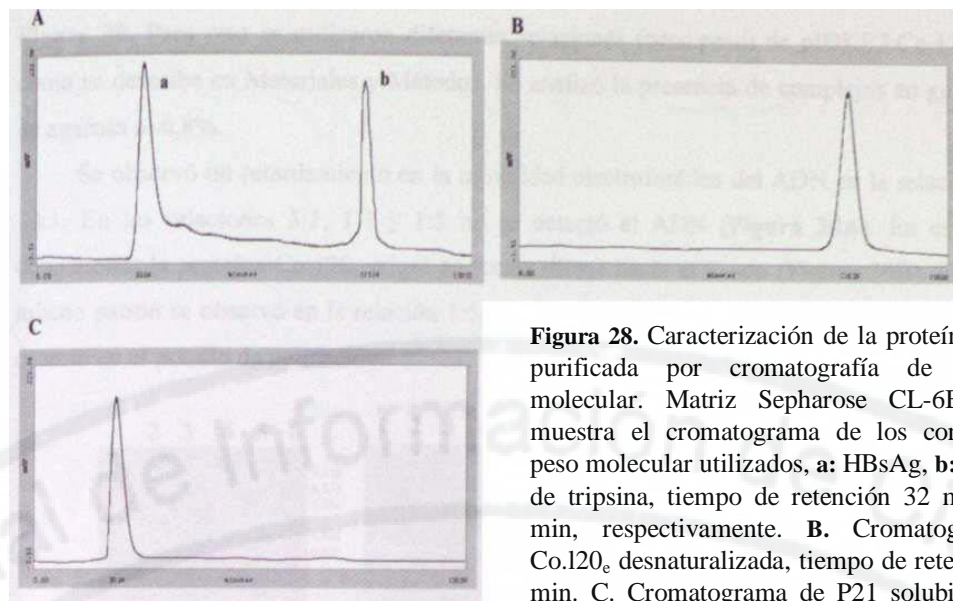


Figura 28. Caracterización de la proteína Co.120_e purificada por cromatografía de exclusión molecular. Matriz Sepharose CL-6B. **A.** Se muestra el cromatograma de los controles de peso molecular utilizados, **a:** HBsAg, **b:** Inhibidor de tripsina, tiempo de retención 32 min y 113 min, respectivamente. **B.** Cromatograma de Co.120_e desnaturalizada, tiempo de retención 115 min. **C.** Cromatograma de P21 solubilizada sin agentes desnaturalizantes, tiempo de retención 29

min.

3.2.7 Caracterización de la proteína Co.120_e por ME

La proteína Co.120_e renaturalizada se analizó por ME como se describe en materiales y métodos.

Se observó la presencia de partículas con un diámetro entre 20-40 nm. (Figura 29).

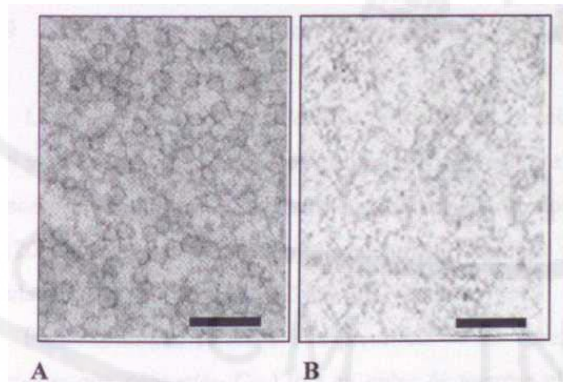


Figura 29. Caracterización por ME de Co.120_e purificada y solubilizada (**A**) o desnaturalizada (**B**). En **A** se observa la presencia de partículas con un diámetro entre 20-40 nm. Barra 150 nm.

3.2.8 Formación de complejos ADN plasmídico-Co.120_e recombinante

Con la finalidad de estudiar la capacidad de Co.120_e de interactuar con ácidos nucleicos, se emplearon la proteína Co.120_e recombinante derivada de *E. coli* (90-95% de pureza, determinada por densitometría) y el plasmidio super-enrollado pIDKE2. La formación de los complejos ADN plasmídico-proteína recombinante se muestra en la

Figura 30. Para esto se utilizaron diferentes relaciones (peso/peso) de pIDKE2:Co.120_e como se describe en Materiales y Métodos. Se analizó la presencia de complejos en geles de agarosa al 0,8%.

Se observó un retardamiento en la movilidad electroforética del ADN en la relación 10:1. En las relaciones 5:1, 1:1 y 1:5 no se detectó el ADN (Figura 30A). En estas condiciones la proteína Co.120_e migró en forma difusa hacia el ánodo (Figura 30B). Este mismo patrón se observó en la relación 1:5, mientras que en la relación 10:1 la proteína se detectó en el pocilio de aplicación.

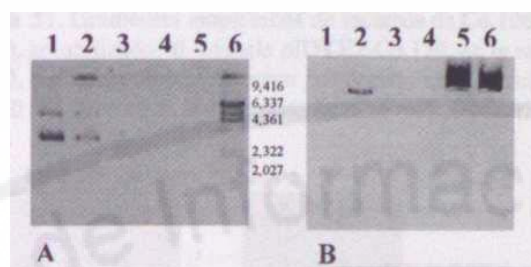


Figura 30. Gel de agarosa al 0,8% mostrando la formación de los complejos ADN-proteína, (A) visualizados con bromuro de etidio. Se aplicó 200 ng de ADN. Líneas: 1. ADN del plasmidio pIDKE2, 2-5. Complejos ADN pIDKE2-proteína Co.120_e en las relaciones 10:1, 5:1, 1:1 y 1:5, 6. Marcador X-DNA-Hind III (kb) y (B) con azul de Comassie. Se aplicó 10 ng de proteína. Líneas: 1. ADN del plasmidio pIDKE2, 2-5. Complejos ADN pIDKE2-proteína Co.120_e en las relaciones 10:1,5:1, 1:1 y 1:5,6. Co.120_e.

3.2.9 Caracterización de los complejos ADN plasmídico-Co. 120_e recombinante en gradientes de sacarosa

Los complejos pIDKE2-Co.120_e formados en la relación 10:1 (en esta relación el ADN y la proteína son visibles en electroforesis de agarosa) se caracterizaron en gradientes de sacarosa. La Figura 31 muestra que la densidad de flotación obtenida para la proteína Co.120_e solubilizada fue 1,15 g/mL, mientras que para la proteína Co.120_e presente en la mezcla con el plasmidio pIDKE2 fue 1,32 g/mL.

Posteriormente, se analizó la presencia de los complejos pIDKE2-Co. 120_e (en las fracciones que contenían Co.120_e) en geles de agarosa al 0,8%. Como se muestra en la Figura 32 en estas fracciones se detectó la presencia de ADN y se observó un retardamiento en su movilidad electroforética con respecto al control pIDKE2. También se detectó la proteína en el pocilio de aplicación.

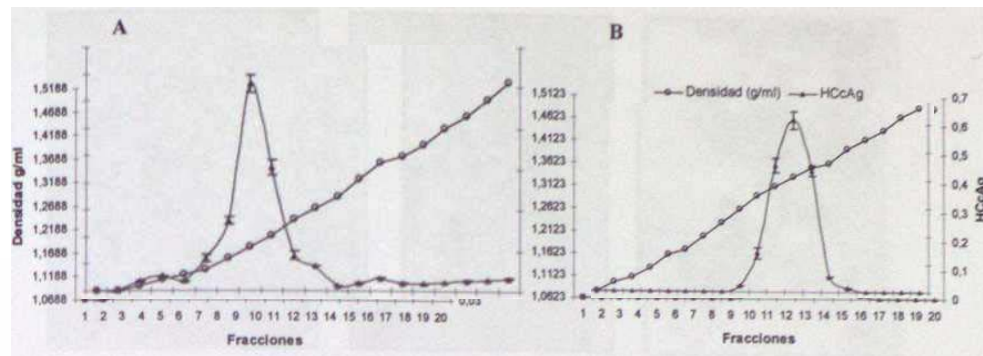


Figura 31. Gradientes isopícnicos de sacarosa de Co.120_e y la mezcla pIDKE2-Co.120_e. **A.** Co.120_e solubilizado. **B.** Mezcla pIDKE2-Co.120_e en la relación 10:1. Los valores de la proteína Co.120_e (HcAg) se determinaron por densitometría como se describe en Materiales y Métodos a DO 620 nm (Derecha). Este experimento se realizó por triplicado

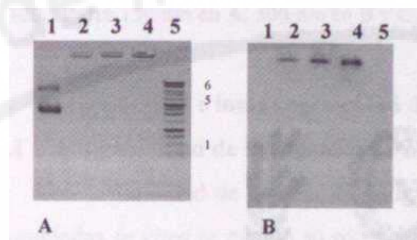


Figura 32. Gel de agarosa al 0,8% mostrando la presencia de los complejos ADN-proteína en las fracciones del gradiente de sacarosa, **(A)** visualizados con bromuro de etidio y **(B)** con azul de Comassie. Líneas: 1. ADN del plasmidio pIDKE2, 2-4. Complejos ADN pIDKE2-proteína Co.120_e presente en las fracciones 12, 13 y 14 del gradiente, respectivamente, 5. Marcador de peso molecular "Leader 500" (Kb).

Para determinar la morfología de las estructuras presentes en las fracciones del gradiente que contenían Co.120_e, tanto de las fracciones de baja densidad (1,15 g/mL) que contienen Co.120_e solubilizado como de las fracciones de alta densidad (1,32 g/mL) que contienen los complejos ADN pIDKE2-proteína Co.120_e, las muestras se evaluaron por ME. Se observó que Co.120_e, presente en las fracciones de baja densidad, estaba formando partículas similares a las obtenidas antes de aplicar en el gradiente con un diámetro entre 20-40 nm (**Figura 33**). Sin embargo, en las fracciones que contienen los complejos ADN pIDKE2-proteína Co.120_e, se observaron partículas heterogéneas de mayor tamaño con un diámetro entre 30-120 nm. También se detectó junto a estas partículas un material de alta densidad. Este material se observó además en la muestra que sólo presenta ADN y no en la que sólo presenta Co. 120_e (**Figura 33**).

Resultados

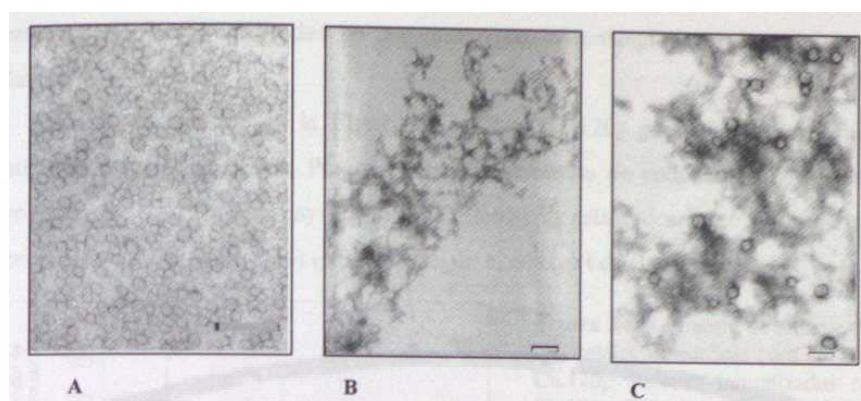


Figura 33. Análisis por ME de la tinción negativa de las muestras, **A.** Fracción de 1,15 g/mL de Co.120_e, **B.** ADN plasmídico pIDKE2, **C.** Complejos de ADN plasmídico pIDKE2-proteína Co.120_e. Barra 150 nm en **A**, 300 nm en **B** y **C**.

3.3 Antigenicidad e inmunogenicidad de las proteínas P21 y Co.120_e recombinantes

3.3.1 Antigenicidad de las proteínas P21 y Co.120_e recombinantes

Con la finalidad de estudiar la antigenicidad de las partículas de P21 y de Co.120_e ensambladas *in vitro* se evaluó su reconocimiento por sueros de individuos infectados por el VHC (procedentes de una seroteca de nuestro laboratorio de individuos seropositivos para VHC por el ensayo comercial UMELOSA anti-VHC). Se utilizaron 68 sueros provenientes de individuos seronegativos para VHC como controles negativos. Como se muestra en la Tabla 1, ambos antígenos fueron reconocidos por los anticuerpos anti- HCCAg generados en la infección natural. Un 90,7% de los sueros reconoció a P21 y un 92,2% a Co.120_e en los ensayos de ELISA.

Tabla I. Reconocimiento de P21 y Co.120_e por los anticuerpos IgG específicos presentes en el suero de los pacientes infectados con el VHC. *n*, número total de sueros ensayados; * Relación de sueros que cumplen el criterio de positividad por ELISA entre el número total de sueros ensayados.

Sueros	<i>n</i>	Reconocimiento (%)	Proteína
Pacientes con VHC	129	117/129* (90,7)	P21
Pacientes con VHC	129	119/129 * (92,2)	Co. 120 _e

3.3.2 Respuesta inmune de anticuerpos y linfoproliferativa inducida en ratones por P21 y Co.120_e Las proteínas P21 y Co.120_e (purificadas y solubilizadas como se describió

Resultados

previamente) fueron utilizadas en un ensayo de inmunización, según se describe en Materiales y Métodos.

Como se muestra en la Figura 34, P21 y Co.120_e generaron una respuesta de anticuerpos IgG específicos. Por otra parte, la respuesta de anticuerpos IgG específicos generada por Co.120_e fue mayor y mostró diferencias estadísticamente significativas a la generada por P21 (Figura 34) ($p < 0,001$, según el ensayo t de Bonferroni).

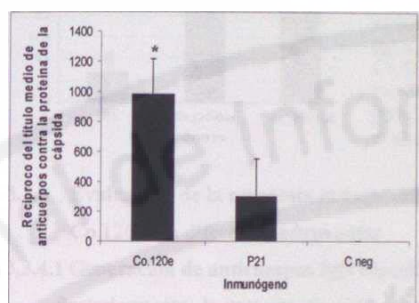


Figura 34. Respuesta de anticuerpos IgG totales específicas para HCcAg. Co.120_e: Ratones inmunizados con Co.120_e, P21: Ratones inmunizados con P21, C neg: Ratones inmunizados con placebo (PBS). Recubrimiento con P21. *($p < 0,001$, según el ensayo t de Bonferroni).

Resulta interesante además que los esplenocitos de los ratones inmunizados con Co.120_e proliferaron en respuesta a P21 (Figura 35). Se tomó como criterio de positividad un IE superior a 3. La respuesta fue antígeno-específica, ya que no se observó proliferación en ausencia de P21 o en presencia de otro antígeno no relacionado (HBsAg). Además, en las células del bazo de los ratones inmunizados con P21 no se observó una proliferación específica con un IE superior a 3.

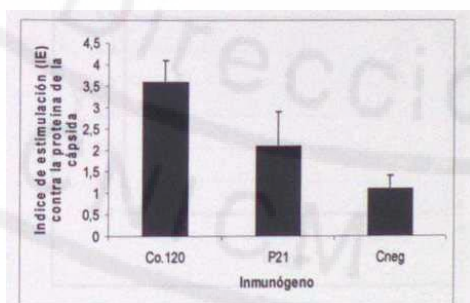


Figura 35. Respuesta linfoproliferativa contra P21 de la mezcla de esplenocitos de 3 ratones inmunizados con: Co.120_e. Proteína recombinante Co.120_e, P21. Proteína recombinante P21, Cneg. Placebo (PBS). Índice de estimulación: relación de c.p.m. de esplenocitos estimulados con el antígeno/ c.p.m. de esplenocitos sin estimular.

3.3.3 Evaluación de la respuesta DTH inducida en ratones por la proteína Co.120_e

Los siguientes experimentos se realizaron con la proteína Co.120_e. Primeramente, se evaluó la respuesta DTH inducida por Co. 120_e en ratones. Según el esquema de inmunización descrito en Materiales y Métodos esta proteína generó una respuesta DTH específica que se observó en la pata de los ratones inmunizados 48 h después del ensayo (Figura 36). Esta respuesta DTH fue superior con diferencias estadísticas a la observada

Resultados

en la pata de los ratones del grupo control inoculados con PBS ($P < 0,001$, según el ensayo t de Bonferroni).

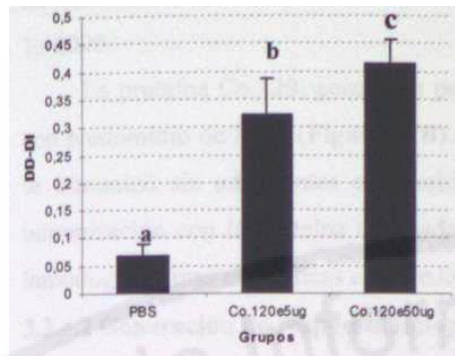


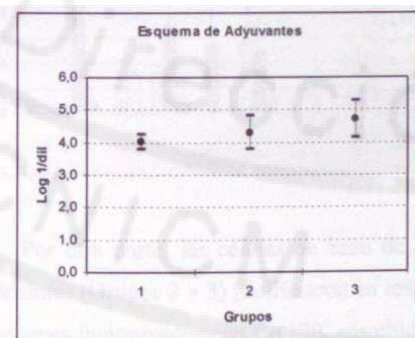
Figura 36. Respuesta de hipersensibilidad retardada (DTH) en los ratones 21 días después de la última inmunización. Se midió la diferencia del diámetro entre la pata sensibilizada con Co.120_e y la pata inoculada con HBsAg como control negativo (DD-DI) 48 h después de la sensibilización, Co.120_e50 Hg: Grupo inmunizado con 50 μ g de Co.120_e, Co. 120*5 ng: Grupo inmunizado con 5 ng de Co.120_e PBS: Grupo inmunizado con placebo (PBS). (b,c>a, $p < 0,001$; c>b, $p < 0,05$ según el ensayo t de Bonferroni)

3.3.4 Evaluación de la respuesta inmune inducida en ratones por la proteína Co.120_e con diferentes adyuvantes

3.3.4.1 Generación de anticuerpos IgG específicos para Co.120_e

Posteriormente, la proteína Co.120_e se utilizó en un ensayo de inmunización con diferentes adyuvantes, según se describe en Materiales y Métodos.

Como se muestra en la Figura 37A la proteína Co.120_e purificada e inoculada sin adyuvantes generó una respuesta de anticuerpos específicos IgG con títulos de 1:12000 dos semanas después de la última inoculación.



Grupos	Razón IgG1/IgG2
G1	0,41
G2	0,54
G3	4,65

A.

B.

Figura 37. A. Respuesta de anticuerpos IgG totales específicos para Co.120_e. Log T. Logaritmo del recíproco del título de IgG específicas. B. Razón IgG 1 /IgG2 del título de IgG específicas. G1. Grupo inmunizado con Co. 120_e solo, G2: Grupo inmunizado con Co.120_e e hidróxido de aluminio, G3: Grupo inmunizado con Co.120_e y Montanide

Resultados

Esta respuesta se incrementó hasta 1:90000 cuando se inoculó la mezcla de Co.120_e y Montanide ISA 888 pero sin diferencias significativas. Para el caso del grupo inmunizado con Co. 120_e e hidróxido de aluminio se obtuvieron títulos de IgG específica de 1:40000.

La proteína Co. 120_e generó un patrón de subclases de inmunoglobulinas específicas con predominio de IgG2 (**Figura 37B**). Este patrón se observó cuando la proteína Co.120_e se inmunizó sin adyuvantes o adsorbida a hidróxido de aluminio. Por el contrario, la inmunización con la proteína mezclada con Montanide generó un patrón de subclases de inmunoglobulinas específicas con predominio de IgG 1 (**Figura 37B**).

3.3.4.2 Generación de respuesta linfoproliferativa específica para Co.120_e

Los esplenocitos de los ratones inmunizados con Co.120_e proliferaron en respuesta al antígeno Co.120_e (**Figura 38**). La respuesta fue antígeno-específica, ya que no se observó proliferación en ausencia de Co.120_e o en presencia de otro antígeno no relacionado (HBsAg). Además, no se observó proliferación en presencia de Co.120_e en los ratones donde solo se inmunizó el adyuvante Montanide ISA 888 (Grupo 4).

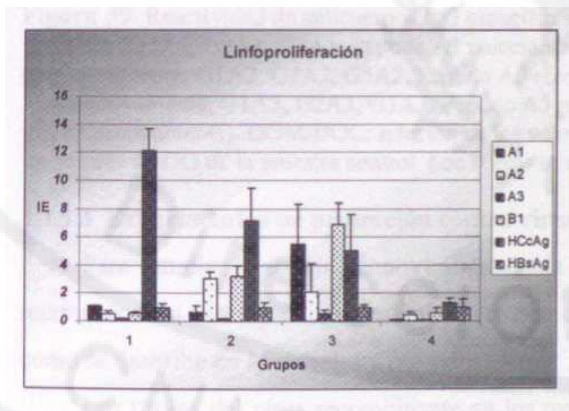


Figura 38. Respuesta linfoproliferativa contra Co.120_e (HcAg) y péptidos de la mezcla de esplenocitos de 3 ratones inmunizados con: 1. Proteína recombinante Co. 120^e 2. Proteína recombinante Co.120_e (hidróxido de aluminio), 3. Proteína recombinante Co.120_e (Montanide). 4. Montanide ISA 888. Índice de estimulación: relación de c.p.m. de esplenocitos estimulados con el antígeno/c.p.m. de esplenocitos sin estimular. Se utilizaron los péptidos A1, A2, A3, y la mezcla de éstos: B1.

Por otra parte, las células de bazo de los ratones inmunizados con Co.120_e y los adyuvantes (Grupos 2 y 3) proliferaron en respuesta a los péptidos A1 o A2. En el caso de los ratones inmunizados con Co.120_e adsorbido en hidróxido de Aluminio, se observó una proliferación específica de los esplenocitos para A2 y B1. Este último es una mezcla de los péptidos A1, A2 y A3. En el caso de los ratones inmunizados con la mezcla Co.120_e y Montanide ISA 888, también se observó una proliferación específica de los esplenocitos para B1. En este caso no se observó una respuesta específica para el péptido A2, aunque los esplenocitos proliferaron en respuesta al péptido A1 (**Figura 38**).

Resultados

Posteriormente se evaluó el reconocimiento de los péptidos utilizados en el experimento anterior por los anticuerpos IgG específicos generados contra Co.l20_e. En la Figura 39 se aprecia un reconocimiento específico del péptido A1 por los sueros de los ratones inmunizados con Co.l20_e y Montanide. Los otros péptidos no fueron reconocidos por estos sueros. Además, ningún suero de los restantes grupos reaccionó contra los péptidos evaluados.

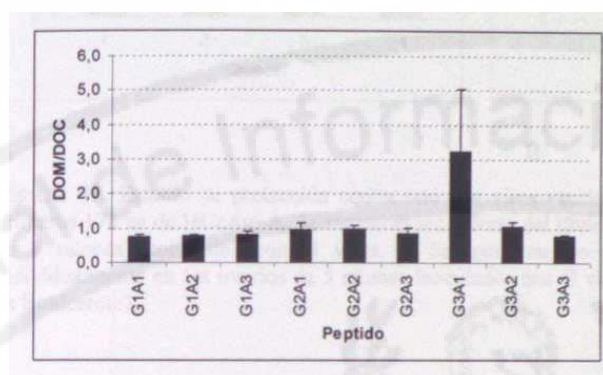


Figura 39. Reactividad de anticuerpos IgG específicos para Co.l20_e frente a diferentes péptidos sintéticos (G1 A1, G2A1, G3A1. Péptido A1 reaccionando contra los sueros de grupos 1, 2 y 3, respectivamente; G1A2, G2A2, G3A2. Péptido A2 reaccionando contra los sueros de grupos 1, 2 y 3 respectivamente; G1 A3, G2A3, G3A3. Péptido A3 reaccionando contra los sueros de grupos 1, 2 y 3, respectivamente). DOM/DOC: relación de los valores de DO de las diferentes muestras sobre los valores de DO de la muestra control. Los sueros se diluyeron 100 veces para el ensayo.

3.3.4.3 Experimentos de protección contra virus vaccinia recombinante

Para estudiar la actividad antiviral generada por Co.l20_e, los ratones inmunizados se retaron con un virus vaccinia recombinante que expresa los primeros 176aa de HCcAg, como se describe en Materiales y Métodos.

Los títulos del virus recombinante en los ovarios se determinaron 5 días después de su inoculación. Se observó una tendencia a la disminución del título viral (diferencia de más de un orden de magnitud) en los ovarios de los ratones inmunizados con la mezcla Co.l20_e y Montanide ISA 888 (Grupo 3) con respecto a lo observado en los otros grupos de ratones (Grupos 1, 2 y 4) (Figura 40A). Cuando se analizaron los ratones individuales del grupo que mostró una disminución de los títulos virales con respecto al grupo control negativo, se observó una diferencia estadística significativa en el título viral en los ovarios (Figura 40B).

Resultados

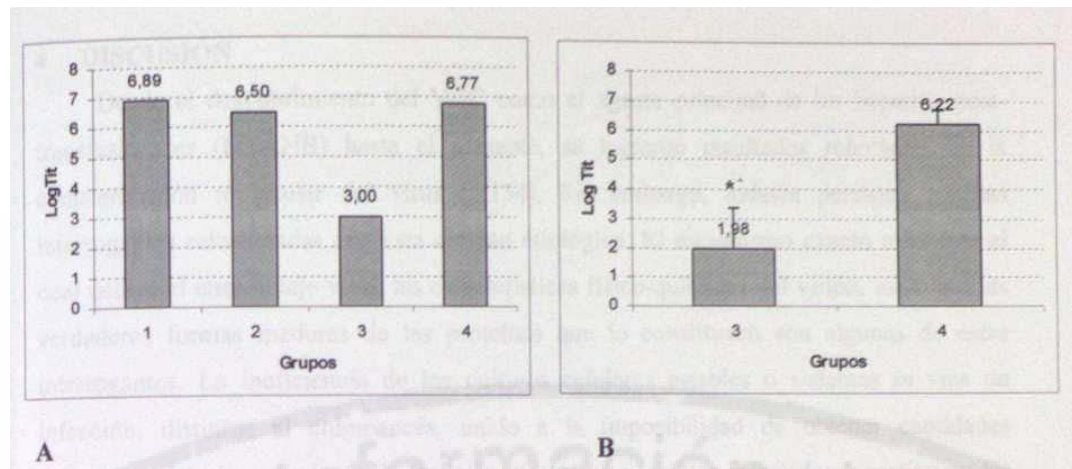


Figura 40. Estudio de protección contra reto con virus vaccinia recombinante que expresa los primeros 176 aa de HCcAg. **A.** Se muestran los valores del título viral de la mezcla de los ovarios de 5 ratones inoculados con el virus. **B** Se muestran los • valores del título viral medido individualmente en los ovarios de 5 ratones inoculados con el virus. *($p < 0,001$, según el ensayo t de Bonferroni).

4 DISCUSIÓN

Desde el descubrimiento del VHC como el agente principal de las hepatitis post- transfusionales (HNANB) hasta el presente, se lograron resultados relevantes en la caracterización molecular del virus (5; 154). Sin embargo, todavía persisten muchas interrogantes relacionadas con esta entidad etiológica. El mecanismo exacto mediante el cual ocurre el ensamblaje viral, las características físico-químicas del virión, así como las verdaderas formas maduras de las proteínas que lo constituyen son algunas de estas interrogantes. La ineficiencia de los cultivos celulares estables o sistemas *in vivo* de infección, distintos al chimpancés, unido a la imposibilidad de obtener cantidades suficientes del virus producto de los bajos títulos en pacientes infectados, constituyen las causas fundamentales del desconocimiento actual (230-236). Estas características también han influido en que no exista una vacuna efectiva contra el VHC.

Las levaduras han sido utilizadas para reproducir el ciclo de replicación de algunos virus animales y humanos (229;237;238). No obstante, hasta el presente no fueron ensayadas como sistema hospedero en el estudio de la biología molecular del VHC. La ventaja de *P. pastoris* con respecto a otras levaduras está dada por una combinación de factores como son: la utilización del promotor fuerte AOXI, que permite una regulación estricta del sistema, la estabilidad genética conferida por la integración de los vectores de expresión al genoma celular, la posibilidad de separar las etapas de crecimiento-producción durante las fermentaciones y el uso de cultivos a altas densidades celulares. También es posible utilizar medios y fuentes de carbono de bajo costo.

Estos hechos, unido a que la levadura *P. pastoris* mostró ser un sistema seguro para la expresión de antígenos virales con fines vacunales y aprovechando la experiencia que existe en el CIGB en la expresión de antígenos heterólogos en levaduras (169), se tuvieron en cuenta para la clonación y expresión de la proteína de la cápsida en la levadura *P. pastoris*. El sistema de expresión utilizado fue el mismo que se utilizó para la obtención del antígeno de superficie del virus de hepatitis B (HBsAg) (250).

4.1 Obtención de HCcAg en la levadura *Pichia pastoris* y su procesamiento

El plasmidio pNAO.CoEl.340 fue construido con el objetivo de expresar el fragmento de ADN codificante para los primeros 339 aa (C-E11) de la poliproteína del VHC, bajo la regulación del promotor pAOXI en *P. pastoris*. Este polipéptido de >39 aa, comprende la proteína HCcAg inmadura (aa 1 al 191) y 147 aa del extremo N-terminal de la proteína El (aa 192-339), pertenecientes a un aislamiento cubano del VHC (**Anexo 1**)

Resultados

(204). Adicionalmente, se utilizaron los plasmidios pNAO.Co.120 y pNAO.Co.176 previamente construidos en nuestro laboratorio. Estos contienen los genes que codifican para los primeros 120 aa (Co. 120L) y 176 aa de HCcAg (Co. 176jJ, respectivamente. Esta última proteína es muy parecida en peso molecular al HCcAg natural detectado en individuos infectados (12).

Para la transformación de la cepa hospedera de *P. pastoris* MP-36, la utilización del plasmidio pNAO.CoEl.340 digerido *AesMSañ* permitió utilizar la estrategia de integración por remplazamiento génico en un sólo paso según fue descrito por Rothstein (239). Las frecuencias de transformación obtenidas estuvieron en el orden de $1,21 \times 10^2$ transformantes/fig de ADN.

Después de la selección de las colonias, la integración de los genes heterólogos en el cromosoma de la levadura se analizó por *Southern blot*. En los transformantes estudiados que contienen el plasmidio pNAO.CoEl.340 se demostró la integración del gen heterólogo en el cromosoma de *P. pastoris*. En uno de los clones (CoEl. 15), la talla observada para la región de integración permite predecir que este clon tiene integrado la región de expresión por un mecanismo de doble recombinación homóloga entre el locus AOXI del cromosoma de *P. pastoris* y las dos regiones de AOXI en el vector: pAOXI y 3' AOXI. Este fenómeno de inserción génica debe dar lugar al fenotipo His³ Muf. El fenotipo Mut^s origina la capacidad defectuosa de crecimiento en metanol, que ocurre por disrupción del gen de la enzima AOXI y el crecimiento en metanol a expensas de la actividad del segundo gen de alcohol oxidasa (AOX2). Estas células tienen una velocidad de crecimiento menor que las células salvajes en presencia de metanol, ya que el gen AOX2 provee una fuente menos eficiente de la enzima alcohol oxidasa (240).

Para el estudio de la expresión de la proteína C-E11, se seleccionó el clon recombinante CoEl. 15 que mostró un patrón de integración por *Southern blot* de recombinación homóloga por doble remplazamiento. De los primeros estudios de expresión de esta cepa y del análisis de las fracciones soluble e insoluble se pudo extraer como primeros resultados que la proteína C-E11 se obtiene fundamentalmente asociada al debris celular y el producto predominante posee un peso molecular de alrededor de 21 kDa (P21). No se observó en estos estudios el reconocimiento de una proteína con un peso molecular de 37 kDa correspondiente al producto íntegro de C-E11 (P37). Ello indica que la expresión del producto C-E11 en *P. pastoris* va acompañada de un procesamiento de la poliproteína. En 1997, Sugrue y colaboradores mostraron que en la levadura metilotrófica *P. pastoris*, al igual que en las células de organismos superiores, la expresión de un

Resultados

fragmento de ADNc codificante para las proteínas estructurales C-prM-E del virus dengue tipo 2 derivó en su procesamiento y la formación de estructuras particuladas semejantes a los viriones nativos (237). El virus dengue tipo 1 es, al igual que el VHC, un miembro de la familia Flaviviridae. Este estudio sugirió la presencia de las proteasas necesarias para el procesamiento viral en la levadura *P. pastoris* y, por tanto, la posibilidad de que las proteínas estructurales de otros virus pertenecientes a la familia Flaviviridae se pudieran procesar.

La aparición simultánea de las proteínas recombinantes de 21 y 23 kDa pudiera explicarse por la introducción de codones de paradas en la secuencia nucleotídica del gen utilizado, sin embargo esta hipótesis está en contradicción con los siguientes resultados: primero, el gen clonado se secuenció y se encontró un único codón de parada en la posición posterior a la que codifica para el aa339 (**Anexo 1**); segundo, el mismo fragmento se expresó en *E. coli*, y se obtuvo una proteína de 37 kDa (P37) que se corresponde con el peso de la molécula íntegra de C-E1_L. Esto demuestra la integridad del gen seleccionado y refuerza la idea de un posible procesamiento en *P. pastoris* de la poliproteína C-E11.

Además, se realizó un experimento de *Western blot* utilizando un AcM anti-E1 obtenido en ratones para comprobar si efectivamente tenía lugar el procesamiento de la poliproteína C-E11. **LOS** resultados demostraron la presencia de bajos niveles de E1 (sólo se detectó con la técnica de *Westem-blot*) aunque con un peso molecular superior al esperado. Si el extremo N-terminal de E1 se procesa en los aa 191-192 debe rendir un producto de 16 kDa. Sin embargo, la proteína detectada se reconoció con un peso de 32 kDa. Este producto pudiera corresponder a una forma glicosilada de E1. Esto es consistente con la glicosilación de 4 de los 5 sitios potenciales de glicosilación que presenta E1 (241). Esto además, está en concordancia con los estudios previos desarrollados por Fournillier-Jacob y colaboradores (242), donde encontraron que al quitar los 4 sitios de glicosilación de E1, ésta disminuyó su masa molecular a la mitad, utilizando la técnica de SDS-PAGE. Esta explicación sugiere la posible entrada de E1 en la vía secretora de la levadura y la funcionalidad de la región hidrofóbica presente en el extremo C-terminal de HCcAg, que está descrita como una secuencia señal de E1 para su translocación al retículo endoplasmático (243). No obstante, para corroborar esta hipótesis se requerirá de experimentos para comprobar la presencia de azúcares en esta molécula, como por ejemplo realizar experimentos de sensibilidad al tratamiento con glicosidasas. Otra posibilidad es que la proteína E1 esté formando un dímero resistente a las condiciones

Resultados

desnaturalizantes que se utilizan en los experimentos de SDS-PAGE.

En nuestro laboratorio se contaba además con un clon de *P. pastoris* para la expresión de una variante de la proteína HCcAg de 176aa (Co.176). En estudios comparativos se pudo definir que la proteína P21 producto de la expresión de C-EI_L, se corresponde con una molécula de aproximadamente 176 aa. La proteína de 23 kDa (P23), que también se reconoce por un AcM dirigido contra los primeros 35 aa de la región N-terminal de HCcAg (AcM SS-HepC.1), posiblemente se corresponda con una molécula de 191 aa. Ambos productos (P21 y P23) pueden ser el resultado de diferentes procesamientos en *P. pastoris* sobre la región hidrofóbica C-terminal de HCcAg. En experimentos de expresión en células de organismos superiores y de transcripción-traducción *in vitro* se demostró la delección de 18 aa de la región C-terminal de la proteína HCcAg (aa 174 al 191). Esta delección ocurre supuestamente a través de un doble procesamiento co-traduccionales que origina el extremo N-terminal de EI (aa 192) y una molécula HCcAg de 173 aa y 21 kDa (12;43; 137; 138). En estos trabajos la expresión de los 191 aa codificantes para la proteína de la cápsida da lugar a una molécula de 23 kDa que sólo se detecta en ausencia de membranas microsomales. Por esto, las proteínas P21 y P23 detectadas por nosotros posiblemente se correspondan con las descritas previamente en otros sistemas de expresión.

Actualmente se desconoce la cinética del procesamiento sobre la región C-terminal de HCcAg, y tampoco la eficiencia en que los dos cortes tienen lugar. Como mencionamos anteriormente, existe cierto consenso en que tal procesamiento ocurre co-traduccionales. Nuestros resultados sugieren que existe una diferencia en la eficiencia de ambos cortes. El hecho de que P37 no se detecte podría explicarse porque el procesamiento que genera P23 es muy eficiente y debe ocurrir co-traduccionales. El corte que genera P21, posiblemente sobre la molécula P23, es menos eficiente si tenemos en cuenta la detección de P23. Con nuestros resultados es imposible discernir si P21 se genera por un corte co-traduccionales o pos-traduccionales. Tampoco se puede descartar que P23 se corresponda con una modificación pos-traduccionales de P21.

4.2 Multimerización y particulación de la proteína HCcAg obtenida de la levadura *Pichia pastoris*

Previamente, Matsumoto y col. (1996) demostraron que la multimerización de la proteína HCcAg y la formación de la nucleocápsida viral debían seguir un mecanismo diferente al descrito para el HBcAg. El dominio de interacción HCcAg-HCcAg se encuentra localizado, según sus resultados, hacia la región N-terminal entre los aa 36 y 91,

Resultados

y la formación de multímeros de esta proteína fue detectable tanto en la fracción soluble como en la asociada a las membranas del RE (151).

En un intento por dilucidar si estaba ocurriendo la multimerización de la proteína de la cápsida recombinante obtenida de *P. pastoris*, se realizaron diferentes experimentos para su caracterización.

Los primeros estudios estuvieron dirigidos a caracterizar la proteína recombinante obtenida en la fracción soluble después de la ruptura celular. La caracterización se realizó desde las etapas tempranas de la expresión de C-E1_L hasta las etapas posteriores. Los resultados obtenidos en los experimentos de centrifugación en gradientes isopícnicos de sacarosa mostraron dos poblaciones de C-E1_L, una población con una densidad de flotación de 1,27 g/mL que está compuesta por P21 y otra con una densidad de flotación de 1,20 g/mL que está compuesta por P21 y P23. La primera población presenta un valor de densidad muy parecido al referido para la nucleocápsida del VHC encontrada en individuos infectados (1,25 g/mL) (244). Además, estas poblaciones migraron en experimentos de cromatografía de exclusión molecular con tiempos de retención similares a los obtenidos para la partícula de HBsAg. Esto indica que las poblaciones de C-E1_L observadas anteriormente forman estructuras de alto peso molecular.

Estos resultados se confirmaron mediante la caracterización por ME. Solamente en la fracción de 1,27 g/mL se encontraron partículas esféricas con diámetro entre 25-35 nm que fueron reconocidas por el AcM SS-HepC.1. En la otra población se observaron agregados proteicos. Las partículas observadas en la población de mayor densidad fueron similares en forma y tamaño a las detectadas en las muestras de biopsias de pacientes infectados con el VHC y a las obtenidas por otros autores en el suero de pacientes infectados con el VHC (después de tratar los viriones con detergentes y liberar la cápsida) (217).

Estudios recientes sugirieron que *P23* ejerce un papel regulador en la localización celular y las funciones de *P21* (137; 138). Cuando *P23* no se detecta, *P21* migra hacia el núcleo de la célula donde puede regular la expresión de determinados genes celulares (138). Cuando *P23* se detecta, entonces *P21* se localiza en el citoplasma celular y cambia sus funciones (137; 138). No obstante, el papel de ambas formas en la replicación y la formación del virion no está caracterizado.

Estudios realizados en paralelo a este trabajo por Falcón y col. mostraron que a las 6 h después de la inducción de la síntesis de P21, ésta migró al núcleo de la célula donde se ensambló en partículas similares a la cápsida del VHC (220). A partir de las 12 h, y coincidiendo con la detección de P23, las partículas migraron hacia el citoplasma y la

Resultados

proteína recombinante no migró al núcleo. Estos datos coincidieron con lo observado anteriormente por otros autores y aportaron como elemento novedoso el ensamblaje nuclear de partículas de P21. Estos estudios apoyan la utilización de la levadura *P. pastoris* como modelo para el estudio de la morfogénesis y el ensamblaje de la cápsida del VHC.

A partir de los resultados presentados en este trabajo postulamos que *P21* pudiera ser el componente fundamental en la constitución de la cápsida del VHC, mientras que *P23* aparentemente no es un componente estructural de la cápsida. *P23* pudiera desempeñar además un papel regulador en la formación de la cápsida viral. Esta hipótesis se refuerza con un reporte simultáneo a nuestro trabajo donde sólo se detectó *P21* en las partículas virales aisladas de los individuos infectados con el VHC (12).

Los resultados analizados hasta el momento sugieren que la poliproteína C-E11 expresada en *P. pastoris* presenta un procesamiento similar al observado en las células de insecto SF-9 y de organismos superiores (BHK-21, CHO). Además, la proteína P21 es similar en peso molecular a la proteína de la cápsida madura detectada por SDS-PAGE en los viriones del VHC; y se ensambla en una partícula similar en forma y tamaño a las cápsidas del VHC detectadas en los hepatocitos humanos, y en densidad de flotación a las cápsidas derivadas de los viriones del VHC presentes en los sueros humanos.

4.3 Ensamblaje *in vitro* de P21 en partículas semejantes a la cápsida del VHC

Algunos ejemplos de la literatura muestran la capacidad de las proteínas que constituyen la nucleocápsida de determinados virus de autoensamblarse *in vitro* en PSV (245-247). Con la finalidad de estudiar la capacidad de la proteína P21 derivada de C-E11 de autoensamblarse *in vitro*, ésta se purificó por diferentes procedimientos utilizando condiciones desnaturizantes fuertes para evitar que la proteína interaccionara con ella misma y disminuir su interacción con otras moléculas.

Después de purificar P21 por ambos métodos, ésta se solubilizó y se disminuyó la presencia de los agentes y condiciones desnaturizantes. Posteriormente, se realizaron diferentes experimentos para estudiar el proceso de multimerización de la forma P21 purificada. En la presente tesis sólo se describieron los resultados obtenidos con la proteína purificada después de eluir del gel. No obstante, se observaron resultados similares independientemente del método de purificación utilizado. En los estudios de ultrafiltración el hecho de que la mayor cantidad de P21 desnaturizada se filtrara eficientemente a través de la membrana indica que éstas moléculas tienen un peso molecular inferior a 300 000 Da. Por otra parte, la mayor proporción de P21 solubilizada no se filtró a través de la membrana. Esto indicó su posible multimerización con un peso molecular superior a los

Resultados

300 000 Da.

Los estudios de centrifugación en gradientes isopícnicos de sacarosa mostraron que la proteína P21 desnaturalizada presenta un valor diferente de densidad de flotación que la proteína P21 solubilizada. Es interesante destacar que el valor de densidad observado para P21 solubilizada (1,24 g/mL) es similar al valor encontrado para las partículas descritas anteriormente aunque ligeramente inferior.

Los estudios de cromatografía de exclusión molecular demostraron que P21 se purificó como un monómero y sugirieron la multimerización de la proteína P21 solubilizada. La caracterización por ME confirmó el ensamblaje de P21 solubilizada en partículas esféricas semejantes a las cápsidas virales con un diámetro entre 25 y 35 nm.

Los experimentos analizados en esta parte del trabajo muestran que es posible purificar la forma P21 como un monómero, en condiciones que disminuyen la interacción entre los monómeros y con otras moléculas (como los ácidos nucleicos) mediante diferentes procedimientos. Las moléculas de P21 pueden solubilizarse y ensamblarse en partículas semejantes en forma y tamaño a las cápsidas del VHC presentes en los hepatocitos humanos, y en densidad de flotación a las cápsidas derivadas de los viriones del VHC presentes en los sueros humanos. Además, indican la posibilidad de que la capacidad de la proteína recombinante de ensamblarse *in vitro* sea una propiedad intrínseca de ésta.

4.4 Obtención de la proteína Co.120_e en *Escherichia coli*

Posteriormente, se decidió abordar la expresión de una variante más pequeña de la proteína HCcAg en el hospedero *E. coli*. Se tomaron en cuenta los siguientes elementos: 1. La proteína madura de la cápsida de los virus relacionados con el VHC (Flavivirus y Pestivirus) se procesa en los primeros 115 aa (248). La proteína HCcAg presenta en los aa 119 y 120 una secuencia de procesamiento similar a la presente en la proteína de la cápsida de Flavivirus y Pestivirus (249); 2. Conocer si la particulación que se observó para P21 fue un resultado singular y específico al utilizar la levadura *P. pastoris* o es un fenómeno más universal propio de la proteína e independiente del hospedero; 3. Conocer si la capacidad de particulación de la proteína HCcAg es una propiedad presente en los primeros 120 aa, o si necesariamente requiere de la región C-terminal; 4. Previamente se habían reportado altos niveles de expresión en *E. coli* de variantes truncadas de HCcAg fusionadas a péptidos estabilizantes. Estas proteínas fueron purificadas con facilidad (250).

Trabajos previos demostraron la influencia de las regiones hidrofóbicas presente en la proteína HCcAg entre los aa 121-151 y los aa 170-190 (251;252), y de codones raros

Resultados

para *E. coli* presentes en la secuencia nucleotídica del gen heterólogo (253) en la baja expresión de esta proteína en *E. coli*. Esto se observó cuando variantes génicas codificantes para HCcAg se clonaron sin fusión alguna a otra secuencia estabilizante. Este problema se resolvió mediante la clonación de secuencias más pequeñas del gen que codifica para HCcAg de modo repetitivo (*tándem*) (254) o por la fusión de estas secuencias a otros polipéptidos estabilizantes (250;252).

La variante del gen que codifica para los primeros 120aa de HCcAg no posee las secuencias hidrofóbicas de HCcAg que dificultan su expresión en *E. coli*. Además contiene los principales epitopos de respuesta humoral reconocidos en la proteína (155) y numerosos epitopos reconocidos por LT CD4+ y LT CD8+ (155;255).

El plasmidio pSLCo.120 se construyó para la expresión del gen codificante para los primeros 120 aa de HCcAg (Co. 120_e) fusionado a una secuencia estabilizante y un motivo de poli-histidina bajo el control del promotor T7. De los primeros análisis de expresión se observó, que aunque la proteína recombinante tiene un peso molecular teórico de 18 kDa, ésta migra como una proteína de 21 kDa. Este tipo de migración retardada en SDS-PAGE se reportó previamente para variantes de HCcAg fusionadas al motivo de poli-histidina (250).

En este caso se obtuvo un nivel de expresión que resultó entre el 12-15% de las proteínas totales de la bacteria. Esta expresión eficiente puede estar influenciada principalmente por los elementos presentes en el plasmidio de origen pRSETA. La secuencia aminoacídica estabilizante hacia el extremo N-terminal, le confiere a las proteínas recombinantes una alta estabilidad frente a la acción de las proteasas según la regla del N-terminal (254). Además, ésta fusión aleja los codones raros en *E. coli* de la secuencia de iniciación de la traducción. Esto puede atenuar de algún modo el efecto negativo de estos codones en la producción de la proteína. Adicionalmente, la ausencia de las principales regiones hidrofóbicas en la proteína Co.120_e puede estar influyendo de modo positivo en la expresión. A esto se puede añadir la contribución a la estabilidad que brinda el hecho de que la cepa BL21(DE3) carece de una proteasa periplasmática (fenotipo omp T-) que puede ser importante en el mantenimiento de la integridad de nuestra proteína al realizar la ruptura celular.

Con respecto al análisis de la localización celular del producto recombinante, la ruptura celular mostró que a medida que la inducción se realizó en estadios más avanzados del crecimiento celular, la proteína tiende a asociarse a la parte insoluble o al debris celular. Mientras que cuando la inducción se realiza a densidades más bajas del cultivo se

aprecia una cierta distribución de Co. 120_e entre la fracción soluble y la insoluble.

4.5 Evaluación de la multimerización y particulación de la proteína Co.120_e obtenida en *Escherichia coli*

Con la finalidad de detectar la posible multimerización de la proteína recombinante obtenida en *E. coli* se realizaron varios experimentos. Esta proteína presenta diferencias con la proteína P21 estudiada previamente. En este caso no contiene los dominios hidrofóbicos en el extremo C-terminal y tiene un polipéptido de fusión en el extremo N- terminal. Estas características pudieran afectar la capacidad de Co.120_e obtenida en *E. coli* para ensamblarse en una partícula.

4.5.1 Estudio de Co.120_e presente en la fracción soluble de la ruptura

Primeramente, la fracción soluble que contiene Co.120_e se caracterizó en gradientes isopícnicos de sacarosa. Estos experimentos evidenciaron que Co.120_e solubilizada tiene asociada una densidad de flotación de 1,28 g/mL. Este valor está en concordancia con la densidad de flotación encontrada previamente para P21, indicando la posible multimerización de esta proteína. El estudio por IME mostró la presencia de partículas semejantes a virus que fueron reconocidas de forma específica por el AcM SS-HepC.1. Esto indicó que la proteína recombinante producida en *E. coli*, fue capaz de ensamblarse en partículas con un tamaño y forma similar a las producidas anteriormente en *P. pastoris*. Estos datos sugieren además que la región C-terminal de la proteína HCcAg (aa 121-173) no es necesaria para obtener una partícula con estas características, y que la fusión del polipéptido estabilizante al extremo N-terminal de Co.120_e no afectó su capacidad de ensamblarse en partículas.

4.5.2 Purificación y ensamblaje *in vitro* de Co.120_e

Posteriormente, y con la finalidad de purificar el antígeno expresado en *E. coli*, se seleccionó la fracción insoluble como fuente primaria porque está más enriquecida en Co.120_e y con menos contaminantes.

Los primeros estudios de caracterización se realizaron con la proteína recombinante semipurificada y solubilizada. Los experimentos por IME confirmaron la presencia de partículas formadas por Co. 120_e similares a las obtenidas directamente en el sobrenadante de ruptura del clon recombinante. Este estudio reforzó la idea de que la proteína HCcAg posee la capacidad de multimerización asociada a los primeros 120 aa, posiblemente a través de las regiones referidas anteriormente por Matsumoto y col (151). También constituyó un indicio de la posibilidad de que esta variante proteica pudiera ensamblarse en partículas *in vitro*.

Resultados

La proteína Co.120_e recombinante fue relativamente fácil de purificar utilizando el sistema de cromatografía líquida de alta eficacia en una matriz de fase reversa de butilo, como paso fundamental. Se obtuvo una preparación entre un 90-95% de pureza según un análisis densitométrico de la proteína en SDS-PAGE. Se utilizaron condiciones desnaturizantes fuertes que permitieron disminuir las interacciones monómero-monómero, del monómero con otras moléculas, y estudiar su capacidad de ensamblaje en PSV *in vitro*. La proteína Co.120_e se solubilizó por resuspensión del material liofilizado en solución salina. La caracterización de la proteína solubilizada en cromatografía de exclusión molecular sugirió la formación de compuestos de alto peso molecular de Co.120_e. Esta misma muestra se caracterizó por ME y se observó la presencia de partículas con un diámetro entre 20-40 nm indicando el ensamblaje *in vitro* de la proteína Co.120_e.

4.6 Formación de complejos ADN plasmídico-Co.120_e recombinante

La capacidad de interactuar con ácidos nucleicos es una propiedad funcional importante de las cápsidas virales (256), previamente demostrada para la proteína HCcAg (33;43;257). Por esto, se decidió evaluar la interacción de las partículas de Co.120_e con ácidos nucleicos. En nuestro caso, se observó que la adición de ADN plasmídico en el proceso de ensamblaje *in vitro* de las partículas de Co.120_e condujo a la formación de partículas de mayor tamaño y más heterogéneas que las observadas anteriormente en este trabajo, con un diámetro entre 30-120 nm.

También los resultados de centrifugación en gradientes de sacarosa y de electroforesis en geles de agarosa sugieren la formación de complejos ADN plasmídico- proteína Co.120_e. La densidad de flotación observada para las partículas de Co.120_e fue 1,15 g/mL, que es menor a la observada anteriormente para las partículas de P21 obtenidas en *P. pastoris*, y para las provenientes de la proteína Co.120_e obtenidas en la fracción soluble. Este hecho quizás esté relacionado con la presencia de otras moléculas, como ácidos nucleicos, en las partículas observadas anteriormente. Resulta interesante destacar que, cuando se adicionó ADN plasmídico a la proteína Co.120_e, se observó un incremento en la densidad de las partículas hasta 1,32 g/mL. En estas fracciones se pudo observar la presencia de ADN plasmídico con un retardamiento en el patrón de migración con respecto al observado para el plasmidio solo, lo que indica la posible formación de complejos ADN- Co.120_e. Esto además sugiere la influencia de los ácidos nucleicos en la densidad de flotación, en el tamaño y el proceso de ensamblaje de las partículas. Esta propiedad, observada en las partículas de Co. 120_e, de interactuar con ácidos nucleicos pudiera tener aplicaciones en la terapia génica. También las partículas compuestas por Co. 120_e pudieran

ser utilizadas como portadoras de vacunas de ADN.

Los datos analizados muestran la capacidad de la proteína Co.120_e de ensamblarse *in vitro* en partículas semejantes en tamaño y forma a las cápsidas del VHC observadas en los hepatocitos humanos. No obstante, estas partículas de Co.120_e muestran una densidad de flotación menor que la reportada anteriormente (217). Esto puede estar relacionado con la presencia de ácidos nucleicos en las partículas naturales. Las cápsidas naturales no envueltas detectadas en los sueros de pacientes infectados con el VHC presentan un valor de densidad de flotación entre 1,32-1,34 g/mL. Estos valores son muy similares a los obtenidos con los complejos ADN-Co.120_e.

4.7 Antigenicidad e inmunogenicidad de P21 y Co.120_e

Las partículas de P21 y Co.120_e generadas *in vitro* mostraron una alta reactividad frente a los sueros de individuos infectados con el VHC. Esto sugiere que estos antígenos fueron reconocidos por los anticuerpos generados durante la infección natural y demuestra su identidad epitópica a nivel de respuesta humoral con la proteína HCcAg natural. El porcentaje de reconocimiento de ambos antígenos por las IgG específicas fue similar. La presencia, en las proteínas P21 y Co. 120_e, de la región inmunodominante para la respuesta humoral (localizada en el extremo N-terminal de HCcAg) pudiera ser la explicación de estos resultados.

Posteriormente, se realizaron experimentos para evaluar la respuesta de inmunoglobulinas IgG y linfoproliferativa en ratones generada por las partículas obtenidas en *P. pastoris* y *E. coli*. En las condiciones experimentales evaluadas, Co.120_e generó una respuesta inmune específica más potente que la generada por P21 medida en anticuerpos IgG de suero y linfoproliferación de las células del bazo contra P21 en los ratones inmunizados.

Los antígenos utilizados en este estudio contienen el extremo N-terminal de HCcAg. Precisamente en esta región se encontraron los principales determinantes antigénicos de la respuesta humoral y los reconocidos por los LT CD4⁺ en la infección natural por el VHC (10;80). Además, esta región resulta altamente inmunogénica para la inducción de una respuesta humoral y de LT CD4⁺ específicos cuando se inmunizaron ratones con la proteína HCcAg (135;258). Uno de los factores que pudieron influir en la menor respuesta inmune observada para P21 con respecto a Co.120_e en las condiciones evaluadas se puede mencionar la capacidad de la proteína HCcAg para afectar la respuesta inmune. Varios estudios indicaron el papel de esta proteína en la supresión de la respuesta inmune por varios mecanismos (259-262). Entre los mecanismos propuestos se encuentra la inhibición

Resultados

de la proliferación de las células T mediante la interacción de HCcAg con el receptor del complemento ClqR (262). Aunque la región de interacción de HCcAg con ClqR no está definida, una posibilidad puede ser que los aa presentes en el extremo C-terminal de HCcAg estén involucrados en este efecto supresor. Recientemente se demostró que el extremo C-terminal de esta proteína es necesario para inducir la multimerización de FAS e inducir apoptosis de la línea de células T transformada Jurkat (263). Otra posibilidad es que en esta región se encuentren epitopos inmunosupresores de la respuesta de células T, que contribuyan a disminuir la respuesta de LT CD4+ auxiliadora o estimular LT reguladores y afectar la respuesta de células B. Recientemente, se demostró la presencia de epitopos inmunosupresores presentes en el extremo C-terminal de HCcAg (264).

Posteriormente, se decidió realizar un estudio de evaluación de la respuesta DTH con el antígeno de mejores resultados en los estudios anteriores (Co.120_e). La inducción de respuesta DTH es una metodología que permite analizar la respuesta específica de linfocitos T *in vivo*. Cuando se utilizan antígenos proteicos en la fase de sensibilización, los mecanismos efectores que median esta respuesta son los LT CD4+ con un patrón Th1 (265). Por esto, la inducción de una respuesta DTH específica en esas condiciones permite medir la respuesta de memoria de LT CD4+ con un patrón Th1 específicos generados por la inmunización *in vivo*. En nuestro caso, la proteína Co.120_e generó una respuesta específica DTH en los animales inmunizados, lo que sugiere la inducción de una respuesta funcionalmente activa de LT CD4+ específicos *in vivo*. Este tipo de respuesta pudiera ser importante en la generación de una inmunidad protectora contra el VHC. Bottarelli y col en el año 1994 demostraron que una fuerte respuesta de LT CD4+ con un patrón Th1, específica para la proteína HCcAg en pacientes infectados con el VHC, se relacionó con el curso benigno de la enfermedad (157). Otros estudios mostraron la presencia de una fuerte respuesta de LT CD4+ específicos para HCcAg en los pacientes que eliminaron el VHC (10).

En el estudio de la evaluación de diferentes adyuvantes sobre la inmunogenicidad de Co. 120_e se observó que los títulos de inmunoglobulinas específicas para Co.120_e fueron ligeramente superiores en los animales donde el Co. 120_e se mezcló con Montanide ISA 888 (1/90000) (Grupo 5) con respecto a los demás grupos (1/12000 y 1/40000 para los Grupos 1 y 2, respectivamente). No obstante, no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos. Estudios previos de inmunización con la proteína HCcAg mostraron que la adición de adyuvantes oleosos a un candidato vacunal compuesto por PSV no aumentó la respuesta inmune humoral inducida contra HCcAg en

Resultados

ratones (135). Además, Polakos y col encontraron un resultado similar al inmunizar monos con una variante de HCcAg con diferentes adyuvantes (125).

En los grupos 1 y 2 se observó que la proteína Co.120_e indujo un patrón de subclases de inmunoglobulinas IgG específicas predominante para IgG2. Resulta interesante destacar que cuando Co.120_e se mezcló con Montanide ISA 888 indujo un patrón de subclases de inmunoglobulinas IgG específicas predominante para IgG 1 (Grupo 3). Este patrón de IgG1 predominante, específico para Co.120_e, es similar al observado durante la infección natural por el VHC contra HCcAg (266).

Tomando en cuenta la importancia que se describió para la respuesta linfoproliferativa de LT CD4+ en la recuperación de los pacientes infectados por el VHC (101), en este trabajo se estudió la respuesta celular-proliferativa hacia Co.120_e. Se observó una respuesta de tipo linfoproliferativa específica en todos los grupos inmunizados con la proteína de interés. Los valores de IE fueron mayores en el grupo de ratones inmunizados sólo con Co.120_e. No obstante, no se pudo realizar una comparación de los resultados con análisis estadístico porque se trabajó con la mezcla de las células de bazo de varios ratones. Para el caso del grupo de ratones inmunizados con Co.120_e absorbido en hidróxido de Aluminio se observó además una respuesta proliferativa específica para uno de los péptidos ensayados (A2). Este péptido comprende un fragmento de HCcAg (aa 50-71) que se solapa con una región que se describió que contiene un epitopo reconocido por LT CD4+ en ratones (258). En el grupo de ratones inmunizados con la mezcla Co.120_e y Montanide, se observó una respuesta proliferativa específica para otro de los péptidos ensayados (A1). Este péptido comprende una región de HCcAg (aa 5-35) que es muy inmunogénica. Este fragmento se solapa con una región que se reconoce eficientemente por linfocitos B (LB) en humanos y ratones (258). Además se describió que contiene un epitopo reconocido por LT CD4+ en ratones (258;267). El péptido A3 no resultó reactivo en este experimento, posiblemente porque el extremo C-terminal de éste no está comprendido en la secuencia de Co. 120_e.

Es posible que los LT CD4+ específicos hayan contribuido en la linfoproliferación observada en los animales inmunizados. En el caso de los ratones de los grupos 2 y 3, se detectó una respuesta linfoproliferativa contra dos péptidos que contienen epitopos reconocidos por LT CD4+ en ratones. No obstante, también es posible la contribución de LB a la linfoproliferación detectada contra estos péptidos, principalmente contra A1, que contiene un epitopo altamente reactivo para los receptores de células B específicos (2⁸). En los sueros de estos ratones se observó una reactividad específica de los anticuerpos IgG

Resultados

contra el péptido A1, lo que refuerza la posibilidad de que las células B pudieran contribuir a la linfoproliferación observada en estos esplenocitos. Diferentes estudios resaltan la importancia de una respuesta linfoproliferativa fuerte de LT CD4+ en la resolución o el curso benigno de la infección por el VHC (10; 157; 158;268). Un estudio posterior a este trabajado realizado por Alvarez-Obregon y col, utilizando Co.120_e como inmunógeno en diferentes cepas de ratones, también demostró la inducción de una fuerte respuesta linfoproliferativa específica para Co.120_e con producción de INF- γ (269). Este estudio refuerza los resultados obtenidos en este trabajo, relacionado con la capacidad de Co.120_e de inducir una fuerte respuesta celular proliferativa.

Además, se realizó un estudio de protección contra reto viral en los ratones inmunizados. Para esto se utilizó una metodología de reto viral desarrollada en nuestro laboratorio (Alvarez-Lajonchere y col., resultados no publicados). La misma consiste en utilizar un virus vaccinia recombinante que expresa como antígeno interno los primeros 176 aa de HCcAg. Este virus se inocula en los animales inmunizados y 5 días después se mide el título viral en los ovarios de los ratones infectados. Los sistemas que utilizan este tipo de metodología describen que los efectores de la respuesta inmune que median la protección viral son los linfocitos T específicos (tanto los LT CD4+ como los LT CD8+) para el antígeno heterólogo expresado por el virus recombinante (226;270). Por esto, la utilización de este sistema en nuestro trabajo permitió evaluar de forma indirecta la respuesta de los LT CD4+ y LT CD8+ específicos medida a través de su capacidad protectora contra el reto viral. Los resultados mostraron que el 60% de los ratones inmunizados con la formulación de Co.120_e y Montanide ISA 888 (Grupo 3) se protegieron contra el reto viral (tres de los ratones retados mostraron protección total de la infección viral en los ovarios). La disminución del título viral en los ovarios de los ratones de este grupo fue estadísticamente significativa comparado con el título viral observado en los ratones inmunizados sólo con Montanide ISA 888 (Grupo 4). Esto permite sugerir que esta formulación fue capaz de generar una respuesta de LT CD4+ y LT CD8+ específicos contra Co. 120_e que permitió la protección contra el reto viral en los ovarios de los ratones inmunizados.

Estudios previos de inmunización con la proteína HCcAg mostraron que la adición de potentes adyuvantes a un candidato vacunal compuesto por PSV, que incluye la región estructural del VHC, aumentó la respuesta inmune de células T inducida contra el HCcAg en ratones (136). Utilizando la misma formulación, se observó recientemente, la inducción de una respuesta de células T protectora contra el reto con un virus vaccinia recombinante

que expresa las proteínas estructurales del VHC (270). Polakos y col encontraron un resultado similar al inmunizar una variante de HCcAg con el adyuvante ISCOMs en monos (125). La capacidad de Co.120_e de inducir una potente respuesta linfoproliferativa y de linfocitos T pudiera ser una característica importante para su consideración como un componente de candidatos vacunales contra el VHC.

4.8 Consideraciones generales

Los resultados experimentales presentados en este trabajo indican que las diferentes variantes recombinantes de HCcAg obtenidas de *P. pastoris* y *E. coli* tienen la capacidad de ensamblarse en partículas. También sugieren que los dominios de la proteína HCcAg responsables de su ensamblaje se encuentran en los primeros 120 aa como se postuló previamente (151).

Recientemente, se refirió que es necesaria la interacción del HCcAg con algunos tipos de ácidos nucleicos (preferentemente los ARN con estructuras secundarias) para su ensamblaje *in vitro* (271). Los autores postularon que la interacción del HCcAg con el ARN viral es un paso crucial en la formación de la cápsida viral. En ese estudio se obtuvieron PSV con un diámetro entre 30 y 120 nm. Aunque no podemos completamente descartar la presencia de ácidos nucleicos en las preparaciones de P21 y Co.120_e utilizadas en los experimentos de ensamblaje *in vitro*, nuestros resultados difieren de los observados por Kunkel y col (271) en que no fue necesario la adición de ácidos nucleicos para obtener la particulación de las proteínas recombinantes. En esta tesis las proteínas P21 y Co.120_e se purificaron utilizando condiciones drásticas de desnaturalización que evitan o disminuyen la interacción de estas proteínas con los ácidos nucleicos. Por ejemplo, en el caso de P21 se utilizó urea, SDS (purificación por electroelución) y bajos valores de pH (pH 2,6), y en el caso de Co.120_e se utilizó urea, acetonitrilo y bajos valores de pH (pH 2,6). Condiciones similares se utilizaron en los experimentos de Kunkel y col (271) para evitar la interacción de los ácidos nucleicos con el HCcAg. Además, la secuencia utilizada en su trabajo pertenece al genotipo Ia, y las variantes utilizadas comprenden los primeros 124 y 179 aa de la poliproteína viral. Recientemente, se describió que las secuencias de HCcAg de los genotipos Ia y Ib presentaban diferencias en cuanto a su localización celular y funciones (263). Por esto, las diferencias en el genotipo utilizado (la secuencia utilizada en nuestro trabajo es del genotipo Ib), en los tamaños de las proteínas recombinantes estudiadas, y en los procesos de purificación y renaturalización pudieran explicar esta contradicción. No obstante, nuestros resultados sugieren que la propiedad de HCcAg (secuencia del genotipo Ib) de ensamblarse en PSV es una capacidad intrínseca de esta proteína.

Resultados

Por otra parte, los tamaños de partícula obtenidos fueron similares a los observados para las cápsidas naturales presentes dentro de los hepatocitos (20-40 nm) y aquellas derivadas de los viriones obtenidos en el suero de pacientes infectados con el VHC (217). Resulta interesante destacar que la adición de ADN plasmídico condujo a la obtención de partículas heterogéneas de mayor tamaño (30-120 nm). Este resultado es similar al obtenido por Kunkel y col (271) donde las partículas obtenidas *in vitro* por la interacción con ácidos nucleicos fueron heterogéneas en tamaño con un diámetro entre 30-120 nm (271). También es similar a las cápsidas naturales observadas en el suero de individuos infectados (272). En este último caso, se observó la presencia de cápsidas naturales no envueltas de tamaño heterogéneo aunque menores en diámetro (35-62 nm) que circulan en el suero de los individuos infectados por el VHC. Estas cápsidas presentaron una densidad de flotación de 1,32-1,34 g/mL, que es muy similar al valor obtenido con las partículas de Col20_e que interactúan con ADN plasmídico.

Finalmente, los estudios inmunológicos sugieren que los epitopos presentes en las partículas constituidas por la proteína Co.120_e son reconocidos por las inmunoglobulinas IgG específicas presentes en los sueros de individuos infectados con el VHC. Nuestros resultados muestran además la capacidad de este antígeno mezclado con Montanide ISA 888 de inducir una respuesta de anticuerpos IgG específica, una respuesta linfoproliferativa de los esplenocitos, y una respuesta específica protectora contra el reto viral en ratones. A partir de estos resultados se realizaron diferentes estudios en nuestro laboratorio que confirmaron la importancia que pudiera tener Co.120_e en futuros candidatos vacunales contra el VHC. Estudios realizados por Dueñas-Carrera y col y Alvarez-Lajonchere y col mostraron la utilidad de la proteína Co. 120_e para ser utilizada en combinación con una vacuna de ADN (273;274). En estos trabajos se logró potenciar la respuesta inmune contra los antígenos de la región estructural incluidos en el candidato vacunal (HCcAg, E1 y E2).

En general, nuestros resultados demuestran la capacidad de las proteínas HCcAg recombinantes, obtenidas de los microorganismos estudiados, de ensamblarse en partículas *in vitro*. Demuestran además su reconocimiento antigénico por los anticuerpos producidos durante la infección natural por el VHC y su capacidad para inducir una respuesta de inmunoglobulinas IgG específicas en ratones y una linfoproliferación específica de los esplenocitos de ratones. Todo esto nos permite corroborar nuestra hipótesis de trabajo y apoya la utilización de la proteína HCcAg recombinante particulada en el diseño racional de candidatos para estrategias vacunales terapéuticas o preventivas contra el VHC.

5 CONCLUSIONES

1. La clonación y síntesis de la poliproteína C-E11 recombinante de un aislamiento cubano del VHC en *P. pastoris* condujo al procesamiento de la proteína cápsida de manera similar a como ocurre en las células de organismos superiores, lo que sugiere la presencia en esta levadura de las enzimas necesarias para el procesamiento de la región estructural del VHC.
2. La proteína de la cápsida del VHC sintetizada en *P. pastoris* se ensambló en partículas constituidas por P21, parecidas en morfología, tamaño y densidad a la reportada para la cápsida del VHC producida por la infección natural, lo que sugiere que P21 pudiera ser el componente principal de las cápsidas naturales del VHC.
3. La proteína P21 recombinante se purificó y se ensambló *in vitro* en partículas parecidas en morfología, tamaño y densidad a la reportada para la cápsida del VHC producida por la infección natural, lo que sugiere la capacidad intrínseca de la proteína de la cápsida del VHC de ensamblarse en una cápsida viral.
4. Se clonó y expresó en *E. coli* una variante génica truncada del VHC que comprende los primeros 120 aa de la proteína de la cápsida viral (Co.120_e), esta proteína se ensambló en partículas parecidas en morfología, tamaño y densidad a la reportada para la cápsida del VHC producida por la infección natural, lo que sugiere que la capacidad de particulación de la proteína de la cápsida reside en los primeros 120 aa.
5. La proteína Co. 120_e se purificó y se ensambló *in vitro* en partículas parecidas en morfología, tamaño y densidad a la reportada para la cápsida del VHC producida por la infección natural, lo que sugiere la capacidad intrínseca de la proteína de la cápsida del VHC de ensamblarse en una cápsida viral así como su capacidad de interactuar con ADN plasmídico.
6. Las variantes recombinantes de la proteína de la cápsida del VHC derivadas de *P. pastoris* y *E. coli* fueron reconocidas por los anticuerpos específicos de los individuos infectados con el VHC, lo cual evidencia su identidad de epitopos con los presentes en la proteína de la cápsida producida por la infección natural.
7. Las proteínas recombinantes de la cápsida del VHC derivadas de *P. pastoris* y *E. coli* inducen en ratones una respuesta de anticuerpos IgG específicos; además la proteína Co. 120_e derivada de *E. coli* demostró su capacidad de inducir diferentes componentes efectores de la respuesta inmune y una respuesta protectora en ratones cuando se mezcla con el adyuvante Montanide ISA 888, lo que sugiere su importancia como

Resultados

componente de futuros candidatos vacunales contra el VHC.

6 RECOMENDACIONES

1. Secuenciar los extremos de las proteínas P21 y P23 para identificar el sitio de procesamiento en *P. pastoris*.
2. Estudiar la naturaleza de la proteína E1 procesada en *P. pastoris*.
3. Estudiar la combinación de la proteína Col20_e con otros antígenos del VHC de interés vacunal, y/o con otros adyuvantes que permitan mejorar la respuesta inmune.
4. Diseñar nuevas estrategias y sistemas de expresión que permitan la generación de partículas virales completas del VHC.
5. Continuar las evaluaciones inmunológicas de la proteína P21 obtenida en *P. pastoris*.
6. Realizar experimentos que permitan dilucidar los mecanismos efectores responsables de la protección contra el reto con el virus vaccinia vvCore observada en el modelo murino, cuando se inmunizó con la mezcla Col20_e-Montanida ISA 888, como por ejemplo: experimentos de depleción *in vivo* de LT CD4+ y LT CD8+, previo al reto viral.

7 REFERENCIAS

1. Abe K, Inchauspe G, Iijisawa K. Genomic characterization and mutation rate of hepatitis C virus isolated from a patient who contracted hepatitis during an epidemic of non-A, non-B hepatitis in Japan. *J Gen Virol* 1992; 73: 2725-9.
2. Alter MJ, Margolis HS, Krawczynski K, Judson FN, Mares A, Alexander WJ, Hu PY, Miller JK, Gerber MA, Sampliner RE. The natural history of community-acquired hepatitis C in the United States. The Sentinel Counties Chronic non-A, non-B Hepatitis Study Team. *N Engl J Med* 1992; 327: 1899-905.
3. Padrón G; and Morales-Grillo J. CIGB, El virus de la hepatitis C. En Bases moleculares para el estudio de las hepatitis virales. 1998 *Elfos scientiae*. Edit. Padrón G. 161-181.
4. Zanetti AR, Romano L, Bianchi S. Primary prevention of hepatitis C virus infection. *Vaccine* 2003; 21: 692-5.
5. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989; 244: 359-62.
6. Hijikata M, Kato N, Ootsuyama Y, Nakagawa M, Shimotohno K. Gene mapping of the putative structural region of the hepatitis C virus genome by in vitro processing analysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 5547-51.
7. Klenerman P, Lechner F, Kantzanou M, Ciurea A, Hengartner H, Zinkemagel R. Viral escape and the failure of cellular immune responses. *Science* 2000; 289: 2003.
8. Farci P, Alter HJ, Govindarajan S, Wong DC, Engle R, Lesniewski RR, Mushahwar IK, Desai SM, Miller RH, Ogata N. Lack of protective immunity against reinfection with hepatitis C virus. *Science* 1992; 258: 135-40.
9. Farci P, Shimoda A, Coiana A, Diaz G, Peddis G, Melpolder JC, Strazzer A, Chien DY, Munoz SJ, Balestrieri A, Purcell RH, Alter HJ. The outcome of acute hepatitis C predicted by the evolution of the viral quasispecies. *Science* 2000; 288: 339-44.
10. Lechner F, Wong DK, Dunbar PR, Chapman R, Chung RT, Dohrenvud P, Robbins G, Phillips R, Klenerman P, Walker BD. Analysis of successful immune responses in persons infected with hepatitis C virus. *J Exp Med* 2000; 191: 1499-512.
11. Santolini E, Migliaccio G, La Monica N. Biosynthesis and biochemical properties of the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1994; 68: 3631-41.
12. Yasui K, Wakita T, Tsukiyama-Kohara K, Funahashi SI, Ichikawa M, Kajita T, Moradpour D, Wands JR, Kohara M. The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1998; 72: 6048-55.
13. Scognamiglio P, Accapezzato D, Casciaro MA, Cacciani A, Artini M, Bruno G, Chircu ML, Sidney J, Southwood S, Abrignani S, Sette A, Bamaba V. Presence of effector CD8+ T cells in hepatitis C virus-exposed healthy seronegative donors. *J Immunol* 1999; 162: 6681-9.
14. Edman JC, Hallewell RA, Valenzuela P, Goodman HM, Rutter WJ. Synthesis of hepatitis B surface and core antigens in *E. coli*. *Nature* 1981; 291: 503-6.
15. Jagdish MN, Ward CW, Gough KH, Tulloch PA, Whittaker LA, Shukla DD. Expression of potyvirus coat protein in *Escherichia coli* and yeast and its assembly into virus-like particles. *J Gen Virol* 1991; 72 (Pt 7): 1543-50.
16. Milich DR. T- and B-cell recognition of hepatitis B viral antigens. *Immunol Today* 1988; 9: 380-6.
17. Storni T, Lechner F, Erdmann I, Bachi T, Jegerlehner A, Dumrese T, Kundig TM, Ruedl C, Bachmann MF. Critical role for activation of antigen-presenting cells in priming of cytotoxic T cell responses after vaccination with virus-like particles. *J Immunol* 2002; 168: 2880-6.
18. Murray K, Bruce SA, Hinnen A, Wingfield P, van Erp PM, de Reus A, Schellekens H. Hepatitis B virus antigens made in microbial cells immunise against viral infection. *EMBO J* 1984; 3: 645-50.
19. Murray K, Bruce SA, Wingfield P, van Erp P, de Reus A, Schellekens H. Protective immunisation against hepatitis B with an internal antigen of the virus. *J Med Virol* 1987; 23: 101-7.
20. Schodel F, Neckermann G, Peterson D, Fuchs K, Fuller S, Will H, Roggendorf M. Immunization with recombinant woodchuck hepatitis virus nucleocapsid antigen or hepatitis B virus nucleocapsid antigen protects woodchucks from woodchuck hepatitis virus infection. *Vaccine* 1999; 17: 624-8.
21. Blumberg BS, Gerstley BJ, Hungerford DA, London WT, Sutnick AI. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med* 1967; 66: 924-31.
22. Krugman S, Giles JP, Hammond J. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *JAMA* 1967; 200: 365-73.
23. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH. Hepatitis A: detection by immune electron microscopy of a viruslike antigen associated with acute illness. *Science* 1973; 182: 1026-8.

24. Feinstone SM, Kapikian AZ, Purcell RH, Alter HJ, Holland PV. Transfusion-associated hepatitis not due to viral hepatitis type A or B. *N Engl J Med* 1975; 292: 767-70.
25. Shimizu YK, Feinstone SM, Purcell RH, Alter HJ, London WT. Non-A, non-B hepatitis: ultrastructural evidence for two agents in experimentally infected chimpanzees. *Science* 1979; 205: 197-200.
26. Miller RH, Purcell RH. Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flavi viruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 2057-61.
27. Takamizawa A, Mori C, Fuke I, Manabe S, Murakami S, Fujita J, Onishi E, Andoh T, Yoshida I, Okayama H. Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *J Virol* 1991; 65: 1105-13.
28. Kaito M, Watanabe S, Tsukiyama-Kohara K, Yamaguchi K, Kobayashi Y, Konishi M, Yokoi M, Ishida S, Suzuki S, Kohara M. Hepatitis C virus particle detected by immunoelectron microscopic study. *J Gen Virol* 1994; 75: 1755-60.
29. Grakoui A, Wychowski C, Lin C, Feinstone SM, Rice CM. Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 1993; 67: 1385-95.
30. Bukh J, Purcell RH, Miller RH. Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 4942-6.
31. Honda M, Ping LH, Rijnbrand RC, Amphlett E, Clarke B, Rowlands D, Lemon SM. Structural requirements for initiation of translation by internal ribosome entry within genome-length hepatitis C virus RNA. *Virology* 1996; 222: 31-42.
32. Selby MJ, Choo QL, Berger K, Kuo G, Glazer E, Eckart M, Lee C, Chien D, Kuo C, Houghton M. Expression, identification and subcellular localization of the proteins encoded by the hepatitis C viral genome. *J Gen Virol* 1993; 74: 1103-13.
33. Shimoike T, Mimori S, Tani H, Matsuura Y, Miyamura T. Interaction of hepatitis C virus core protein with viral sense RNA and suppression of its translation. *J Virol* 1999; 73: 9718-25.
34. Baumert TF, Ito S, Wong DT, Liang TJ. Hepatitis C virus structural proteins assemble into viruslike particles in insect cells. *J Virol* 1998; 72: 3827-36.
35. Shimizu YK, Feinstone SM, Kohara M, Purcell RH, Yoshikura H. Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology* 1996; 23: 205-9.
36. Fournillier JA, Cahour A, Escriou N, Girad M, Wychowski C. Processing of the E1 glycoprotein of hepatitis C virus expressed in mammalian cells. *J Gen Virol* 1996; 77: 1055-64.
37. Cocquerel L, Duvet S, Meunier JC, Pillez A, Cacan R, Wychowski C, Dubuisson J. The transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E1 is a signal for static retention in the endoplasmic reticulum. *J Virol* 1999; 73: 2641-9.
38. Kumar U, Monjardino J, Thomas HC. Hypervariable region of hepatitis C virus envelope glycoprotein (E2/NS1) in an agammaglobulinemic patient. *Gastroenterology* 1994; 106: 1072-5.
39. Shirai M, Arichi T, Chen M, Masaki T, Nishioka M, Ikeda K, Takahashi H, Enomoto N, Saito T, Major ME, Nakazawa T, Akatsuka T, Feinstone SM, Berzofsky JA. T cell recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. *J Immunol* 1999; 162: 568-76.
40. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282: 938-41.
41. Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR, Donovan GP, Maddon PJ, Dragic T, Olson WC. L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 100: 4498-503.
42. Nowicki MJ, Balistreri WF. The hepatitis C virus: identification, epidemiology, and clinical controversies. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1995; 20: 248-74.
43. Santolini E, Pacini L, Fipaldini C, Migliaccio G, Monica N. The NS2 protein of hepatitis C virus is a transmembrane polypeptide. *J Virol* 1995; 69: 7461-71.
44. Kolykhalov AA, Mihalik K, Feinstone SM, Rice CM. Hepatitis C virus-encoded enzymatic activities and conserved RNA elements in the 3' nontranslated region are essential for virus replication in vivo. *J Virol* 2000; 74: 2046-51.
45. Erdtmann L, Franck N, Lerat H, Le Seyec J, Gilot D, Cannie I, Gripon P, Hibner U, Ciuguon-Guillouzo C. The hepatitis C virus NS2 protein: an inhibitor of CIDE-B-induced apoptosis. *J Biol Chem* 2003.
46. Dumoulin FL, von dem BA, Li J, Khamzina L, Wands JR, Sauerbruch T, Spengler U. Hepatitis C virus NS2 protein inhibits gene expression from different cellular and viral promoters in hepatic and nonhepatic cell lines. *Virology* 2003; 305: 260-6.

47. Stinkuhler C, Tomei L, De Francesco R. In vitro activity of hepatitis C virus protease NS3 purified from recombinant Baculovirus-infected Sf9 cells. *J Biol Chem* 1996; 271: 6367-73.
48. Kato N. Molecular virology of hepatitis C virus. *Acta Med Okayama* 2001; 55: 133-59.
49. Reed KE, Rice CM. Molecular characterization of hepatitis C virus. *Curr Stud Hematol Blood Transfus* 1998; 1-37.
50. Murakami T, Enomoto N, Kurosaki M, Izumi N, Marumo F, Sato C. Mutations in nonstructural protein 5A gene and response to interferon in hepatitis C virus genotype 2 infection. *Hepatology* 1999;30:1045-53.
51. Lohmann V, Komer F, Herian U, Bartenschlager R. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J Virol* 1997; 71: 8416-28.
52. Hwang SB, Park KJ, Kim YS, Sung YC, Lai MM. Hepatitis C virus NS5B protein is a membrane-associated phosphoprotein with a predominantly perinuclear localization. *Virology* 1997; 227- 439-46.
53. Kato N. Genome of human hepatitis C virus (HCV): gene organization, sequence diversity, and variation. *Microb Comp Genomics* 2000; 5: 129-51.
54. Yanagi M, St Claire M, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. In vivo analysis of the 3' untranslated region of the hepatitis C virus after in vitro mutagenesis of an infectious cDNA clone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 2291-5.
55. Fujimura Y, Ishimoto S, Shimoyama T, Narita N, Kuze Y, Yoshioka A, Fukui H, Tanaka T, Tsuda F, Okamoto H, Miyakawa Y, Mayumi M. Genotypes and multiple infections with hepatitis C virus in patients with haemophilia A in Japan. *J Viral Hepat* 1996; 3: 79-84.
56. Bukh J, Miller RH, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus: quasispecies and genotypes. *Semin Liver Dis* 1995; 15: 41-63.
57. Farci P, Purcell RH. Clinical significance of hepatitis C virus genotypes and quasispecies. *Semin Liver Dis* 2000; 20: 103-26.
58. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J Gen Virol* 1993; 74: 2391-9.
59. Zein NN, Persing DH. Hepatitis C genotypes: current trends and future implications. *Mayo Clin Proc* 1996; 71:458-62.
60. Farci P, Strazzeri R, Alter HJ, Farci S, Degioannis D, Coiana A, Peddis G, Usai F, Serra G, Chessa L, Diaz G, Balestrieri A, Purcell RH. Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 3081-6.
61. Farci P. Hepatitis C virus. The importance of viral heterogeneity. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 895-916.
62. Prince AM, Shata MT. Immunoprophylaxis of hepatitis C virus infection. *Clin Liver Dis* 2001; 5: 1091-103.
63. Ismay SL, Thomas S, Fellows A, Keller A, Kenrick KG, Archer GT, Wylie BR, Cossart YE. Post-transfusion hepatitis revisited. *Med J Aust* 1995; 163: 74-7.
64. Donahue JG, Munoz A, Ness PM, Brown DE, Jr., Yawn DH, McAllister HA, Jr., Reitz BA, Nelson KE. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 1992; 327: 369- 73.
65. Lai ME, De Virgili S, Argioli F, Farci P, Mazzoleni AP, Lisci V, Rapicetta M, Clemente MG, Nurchis P, Arnone M. Evaluation of antibodies to hepatitis C virus in a long-term prospective study of posttransfusion hepatitis among thalassemic children: comparison between first- and second-generation assay. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1993; 16: 458-64.
66. Simmonds P, Zhang LQ, Watson HG, Rebus S, Ferguson ED, Balfe P, Leadbetter GH, Yap PL, Peutherer JF, Ludlam CA. Hepatitis C quantification and sequencing in blood products, haemophiliacs, and drug users. *Lancet* 1990; 336: 1469-72.
67. Jonas MM, Zilleruelo GE, LaRue SI, Abitbol C, Strauss J, Lu Y. Hepatitis C infection in a pediatric dialysis population. *Pediatrics* 1992; 89: 707-9.
68. Ko YC, Ho MS, Chiang TA, Chang SJ, Chang PY. Tattooing as a risk of hepatitis C virus infection. *J Med Virol* 1992; 38: 288-91.
69. Tor J, Libre JM, Carbonell M, Muga R, Ribera A, Soriano V, Clotet B, Sabria M, Foz M. Sexual transmission of hepatitis C virus and its relation with hepatitis B virus and HIV. *BMJ* 1990. 301. 1130-3.
70. Thomas DL, Zenilman JM, Alter HJ, Shih JW, Galai N, Carella AV, Quinn IC, Sexual transmission of hepatitis C virus among patients attending sexually transmitted diseases clinics in Baltimore-an analysis of 309 sex partnerships. *J Infect Dis* 1995; 171: 768-75.

71. McKenna JG, Evans G, Lyttle PH, Couper A. Hepatitis C virus seroprevalence in patients attending a sexual health centre. *N Z Med J* 1994; 107: 8-10.
72. MacDonald M, Crofts N, Kaldor J. Transmission of hepatitis C virus: rates, routes and cofactors. *Epidemiol Rev* 1996; 18: 137-48.
73. Lin HH, Kao JH, Hsu HY, Ni YH, Yeh SH, Hwang LH, Chang MH, Hwang SC, Chen PJ, Chen DS. Possible role of high-titer maternal viremia in perinatal transmission of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 1994; 169: 638-41.
74. Wejstal R, Widell A, Mansson AS, Hermodsson S, Norkrans G. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 1992; 117: 887-90.
75. Zanetti AR, Tanzi E, Paccagnini S, Principi N, Pizzocolo G, Caccamo ML, D'Amico E, Cambie G, Vecchi L. Mother-to-infant transmission of hepatitis C virus. Lombardy Study Group on Vertical HCV Transmission. *Lancet* 1995; 345: 289-91.
76. Lam NP. Hepatitis C: natural history, diagnosis, and management. *Am J Health Syst Pharm* 1999; 56: 961-73.
77. Yenen OS, Badur S. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in blood donors and risk groups in Istanbul, Turkey. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1991; 10: 93-4.
78. Prince AM, Brotman B, Huima T, Pascual D, Jaffery M, Inchauspe G. Immunity in hepatitis C infection. *J Infect Dis* 1992; 165: 438-43.
79. Cemy A, McHutchison JG, Pasquinelli C, Brown ME, Brothers MA, Grabscheid B, Fowler P, Houghton M, Chisari FV. Cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis C virus-derived peptides containing the HLA A2.1 binding motif. *J Clin Invest* 1995; 95: 521-30.
80. Jackson P, Petrik J, Alexander GJ, Pearson G, Allain JP. Reactivity of synthetic peptides representing selected sections of hepatitis C virus core and envelope proteins with a panel of hepatitis C virus-seropositive human plasma. *J Med Virol* 1997; 51: 67-79.
81. Nowicki MJ, Welch TR, Ahmad N, Kuramoto IK, Mendoza EC, Zeldis JB, Baroudy BM, Balistreri WF. Absence of hepatitis B and C viruses in pediatric idiopathic membranoproliferative glomerulonephritis. *Pediatr Nephrol* 1995; 9: 16-8.
82. Hwang LH, Yang PM, Lai MY, Chiang BL, Kao JH, Wang JT, Lee SY, Chian HM, Chi WK, Chu YD, Chen PJ, Chen DS. Identification of humoral antigenic determinants in the hepatitis C virus NS3 protein. *J Infect Dis* 1996; 174: 173-6.
83. Neville JA, Prescott LE, Bhattacharjee V, Adams N, Pike I, Rodgers B, el Zayadi A, Hamid S, Dusheiko GM, Saeed AA, Haydon GH, Simmonds P. Antigenic variation of core, NS3, and NS5 proteins among genotypes of hepatitis C virus. *J Clin Microbiol* 1997; 35: 3062-70.
84. Goeser T, Muller HM, Solbach C, Gmelin K, Kurzen F, Kommerell B, Theilmann L. Prevalence and serological manifestation of hepatitis C virus infection in patients with hepatitis non-A, non-B: a follow-up study. *Presse Med* 1994; 23: 793-6.
85. Alvarado EC, Leroux-Roels G. [Hepatitis C immunology]. *Rev Invest Clin* 1999; 51: 315-22.
86. Scarselli E, Cerino A, Esposito G, Silini E, Mondelli MU, Traboni C. Occurrence of antibodies reactive with more than one variant of the putative envelope glycoprotein (gp70) hypervariable region 1 in viremic hepatitis C virus-infected patients. *J Virol* 1995; 69: 4407-12.
87. Zibert A, Dudziak P, Schreier E, Roggendorf M. Characterization of antibody response to hepatitis C virus protein E2 and significance of hypervariable region 1-specific antibodies in viral neutralization. *Arch Virol* 1997; 142: 523-34.
88. Ishii K, Rosa D, Watanabe Y, Katayama T, Harada H, Wyatt C, Kiyosawa K, Aizaki H, Matsuura Y, Houghton M, Abrignani S, Miyamura T. High titers of antibodies inhibiting the binding of envelope to human cells correlate with natural resolution of chronic hepatitis C. *Hepatology* 1998; 28: 1117-20.
89. Kato N, Sekiya H, Ootsuyama Y, Nakazawa T, Hijikata M, Ohkoshi S, Shimotohno K. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol* 1993; 67: 3923-30.
90. Forns X, Thimme R, Govindarajan S, Emerson SU, Purcell RH, Chisari FV, Bukh J. Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 11118-23.
91. Ferrari C, Valli A, Galati L, Penna A, Scaccaglia P, Giuberti T, Schianchi C, Missale G, Mann MG, Fiaccadori F. T-cell response to structural and nonstructural hepatitis C virus antigens in persistent and self-limited hepatitis C virus infections. *Hepatology* 1994; 19: 286-95.
92. Cerny A, Chisari FV. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999; 30: 595-601.

93. Leroux-Rocls G, Esquivel CA, DeLeys R, Stuyver L, Elewaut A, Philippe J, Desombere I, Paradijs J, Maertens G. Lymphoproliferative responses to hepatitis C virus core, E1, E2, and NS3 in patients with chronic hepatitis C infection treated with interferon alfa. *Hepatology* 1996; 23: 8-16.
94. Wertheimer AM, Miner C, Lewinsohn DM, Sasaki AW, Kaufman E, Rosen HR. Novel CD4+ and C'D8+ T-cell determinants within the NS3 protein in subjects with spontaneously resolved HCV infection. *Hepatology* 2003; 37: 577-89.
95. Missale G, Bertoni R, Lamonaca V, Valli A, Massari M, Mori C, Rumi MG, Houghton M, Fiaccadori F, Ferrari C. Different clinical behaviors of acute hepatitis C virus infection are associated with different vigor of the anti-viral cell-mediated immune response. *J Clin Invest* 1996; 98: 706-14.
96. Paul A. [Hepatitis C. Saving the liver]. *MMW Fortschr Med* 1999; 141: 16.
97. Torre D, Zeroli C, Giola M, Ferrario G, Fiori GP, Bonetta G, Tambini R. Serum levels of interleukin-1 alpha, interleukin-1 beta, interleukin-6, and tumor necrosis factor in patients with acute viral hepatitis. *Clin Infect Dis* 1994; 18: 194-8.
98. Schirren CA, Jung MC, Gerlach JT, Worzfeld T, Baretton G, Mamin M, Hubert GN, Houghton M, Pape GR. Liver-derived hepatitis C virus (HCV)-specific CD4(+) T cells recognize multiple HCV epitopes and produce interferon gamma. *Hepatology* 2000; 32: 597-603.
99. He XS, Rehermann B, Lopez-Labrador FX, Boisvert J, Cheung R, Mumm J, Wedemeyer H, Berenguer M, Wright TL, Davis MM, Greenberg HB. Quantitative analysis of hepatitis C virus-specific CD8(+) T cells in peripheral blood and liver using peptide-MHC tetramers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 5692-7.
100. Barnes E, Lauer G, Walker B, Klenerman P. T cell failure in hepatitis C virus infection. *Viral Immunol* 2002; 15: 285-93.
101. Lechner F, Gruener NH, Urbani S, Uggeri J, Santantonio T, Kammer AR, Cemy A, Phillips R, Ferrari C, Pape GR, Klenerman P. CD8+ T lymphocyte responses are induced during acute hepatitis C virus infection but are not sustained. *Eur J Immunol* 2000; 30: 2479-87.
102. Wedemeyer H, He XS, Nascimbeni M, Davis AR, Greenberg HB, Hoofnagle JH, Liang TJ, Alter H, Rehermann B. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 2002; 169: 3447-58.
103. Koziel MJ, Walker BD. Characteristics of the intrahepatic cytotoxic T lymphocyte response in chronic hepatitis C virus infection. *Springer Semin Immunopathol* 1997; 19: 69-83.
104. Nelson DR, Marousis CG, Davis GL, Rice CM, Wong J, Houghton M, Lau JY. The role of hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocytes in chronic hepatitis C. *J Immunol* 1997; 158: 1473-81.
105. Cooper S, Erickson AL, Adams EJ, Kansopon J, Weiner AJ, Chien DY, Houghton M, Parham P, Walker CM. Analysis of a successful immune response against hepatitis C virus. *Immunity* 1999; 10: 439-49.
106. Penna A, Missale G, Lamonaca V, Pili M, Mori C, Zanelli P, Cavalli A, Elia G, Ferrari C. Intrahepatic and circulating HLA class II-restricted, hepatitis C virus-specific T cells: functional characterization in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2002; 35: 1225-36.
107. Thio CL, Thomas DL, Goedert JJ, Vlahov D, Nelson KE, Hilgartner MW, O'Brien SJ, Karacki P, Marti D, Astemborski J, Carrington M. Racial differences in HLA class II associations with hepatitis C virus outcomes. *J Infect Dis* 2001; 184: 16-21.
108. Cramp ME, Carucci P, Underhill J, Naoumov NV, Williams R, Donaldson PT. Association between HLA class II genotype and spontaneous clearance of hepatitis C viraemia. *J Hepatol* 1998; 29: 207-13.
109. Zavaglia C, Martinetti M, Silini E, Bottelli R, Daielli C, Asti M, Airoidi A, Salvaneschi L, Mondelli MU, Ideo G. Association between HLA class II alleles and protection from or susceptibility to chronic hepatitis C. *J Hepatol* 1998; 28: 1-7.
110. Erickson AL, Kimura Y, Igarashi S, Eichelberger J, Houghton M, Sidney J, McKinney D, Sette A, Hughes AL, Walker CM. The outcome of hepatitis C virus infection is predicted by escape mutations in epitopes targeted by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity* 2001; 15: 883-95.
111. Weiner A, Erickson AL, Kansopon J, Crawford K, Muchmore E, Hughes AL, Houghton M, Walker CM. Persistent hepatitis C virus infection in a chimpanzee is associated with emergence of a cytotoxic T lymphocyte escape variant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 2755-9.
112. Eckels DD, Zhou H, Bian TH, Wang H. Identification of antigenic escape variants in an immunodominant epitope of hepatitis C virus. *Int Immunol* 1999; 11: 577-83.
113. Kaneko T, Moriyama T, Udaka K, Hiroishi K, Kita H, Okamoto H, Yagita H, Okumura K, Imawari M. Impaired induction of cytotoxic T lymphocytes by antagonism of a weak agonist borne by a variant hepatitis C virus epitope. *Eur J Immunol* 1997; 27: 1782-7.

114. Tsai SL, Chen YM, Chen MH, Huang CY, Sheen IS, Yeh CT, Huang JH, Kuo GC, Iaw YF. Hepatitis C virus variants circumventing cytotoxic T lymphocyte activity as a mechanism of chronicity. *Gastroenterology* 1998; 115: 954-65.
115. Feinstone SM. The virology of hepatitis C. *J Gastroenterol Hepatol* 1991; 6 Suppl 1:26-8 : 26-8
116. Moriya K, Fujie H, Shintani Y, Yotsuyanagi H, Tsutsumi T, Ishibashi K, Matsuura Y, Kimura S, Miyamura T, Koike K. The core protein of hepatitis C virus induces hepatocellular carcinoma in transgenic mice. *Nat Med* 1998; 4: 1065-7.
117. Park JS, Yang JM, Min MK. Hepatitis C virus nonstructural protein NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 267: 581-7.
118. Sakamuro D, Iurukawa I, Ikegami T. Hepatitis C virus nonstructural protein NS3 transforms NIH 3T3 cells. *J Virol* 1995; 69: 3893-6.
119. Romeo R, Rumi M, Colombo M. Alpha interferon treatment of chronic hepatitis C. *Biomed Pharmacother* 1995; 49: 111-5.
120. Bernstein D, Kleinman L, Barker CM, Revicki DA, Green J. Relationship of health-related quality of life to treatment adherence and sustained response in chronic hepatitis C patients. *Hepatology* 2002; 35: 704-8.
121. McHutchison JG, Gordon SC, Schiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, Goodman ZD, Ling MH, Cort S, Albrecht JK. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339: 1485-92.
122. Chen M, Sallberg M, Sonnerborg A, Weiland O, Mattsson L, Jin L, Birkett A, Peterson D, Milich DR. Limited humoral immunity in hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 1999; 116: 135-43.
123. Choo QL, Kuo G, Ralston R, Weiner A, Chien D, Van Nest G, Han J, Berger K, Thudium K, Kuo C. Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 1294-8.
124. Maertens G, Priem S, Ducatteeuw A, Verschoorl E, Verstrepen B, Roskams T, Desmet V, Fuller S, van Hoek K, Vandepoosele P, Bosman F, Buyse MA, van Doorn LJ, Heeney J, Kos A, Depla E. Improvement of chronic active hepatitis C in chronically infected chimpanzees after therapeutic vaccination with the HCV E1 protein. *Acta Gastroenterol Belg* 2000; 63: 203.
125. Polakos NK, Drane D, Cox J, Ng P, Selby MJ, Chien D, O'Hagan DT, Houghton M, Paliard X. Characterization of hepatitis C virus core-specific immune responses primed in rhesus macaques by a nonclassical ISCOM vaccine. *J Immunol* 2001; 166: 3589-98.
126. Dou J, Liu K, Chen Z, Wo J, He N, Liu Y, Zhang M, Wang X, Xu C. Effect of immunization in mice with recombinant DNA encoding the hepatitis C virus structural protein. *Chin Med J (Engl)* 1999; 112: 1036-9.
127. Nishimura Y, Kamei A, Uno-Furuta S, Tamaki S, Kim G, Adachi Y, Kuribayashi K, Matsuura Y, Miyamura T, Yasutomi Y. A single immunization with a plasmid encoding hepatitis C virus (HCV) structural proteins under the elongation factor 1-alpha promoter elicits HCV-specific cytotoxic T-lymphocytes (CTL). *Vaccine* 1999; 18: 675-80.
128. Lagging LM, Meyer K, Hoft D, Houghton M, Belshe RB, Ray R. Immune responses to plasmid DNA encoding the hepatitis C virus core protein. *J Virol* 1995; 69: 5859-63.
129. Sato J, Murata K, Lechmann M, Manickan E, Zhang Z, Wedemeyer H, Rehermann B, Liang I J. Genetic immunization of wild-type and hepatitis C virus transgenic mice reveals a hierarchy of cellular immune response and tolerance induction against hepatitis C virus structural proteins. *J Virol* 2001; 75: 12121-7.
130. Dueñas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Alvarez-Obregon JC, Herrera A, Lorenzo LJ, Pichardo D, Morales J. A truncated variant of the hepatitis C virus core induces a slow but potent immune response in mice following DNA immunization. *Vaccine* 2000; 19: 992-7.
131. Feng Z, Zhou Y, Jia Z, et A. [Immune responses to recombinant expression plasmid encoding hepatitis C virus core antigen]. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 1999; 38: 462-5.
132. Dueñas-Carrera S, Alvarez-Lajonchere L, Cesar Alvarez-Obregon J, Perez A, Acosta-Rivero N, Vazquez DM, Martinez G, Vina A, Pichardo D, Morales J. Enhancement of the immune response generated against hepatitis C virus envelope proteins after DNA vaccination with poly protein- encoding plasmids. *Biotechnol Appl Biochem* 2002; 35: 205-12.
133. Baumert TF, Vergalla J, Sato J, Thomson M, Lechmann M, Herion D, Greenberg HB, Ito S, Liang TJ. Hepatitis C virus-like particles synthesized in insect cells as a potential vaccine candidate. *Gastroenterology* 1999; 117: 1397-407.
134. Baumert TF, Wellnitz S, Aono S, Sato J, Herion D, Tilman GJ, Pape GR, Lau JY, Hoonagle JH, Blum HE, Liang TJ. Antibodies against hepatitis C virus-like particles and viral clearance in acute and chronic hepatitis C. *Hepatology* 2000; 32: 610-7.

135. Lechmann M, Múrala K, Sato J, Vergalla J, Baumert TF, Liang TJ. Hepatitis C virus-like particles induce virus-specific humoral and cellular immune responses in mice. *Hepatology* 2000; 34: 417-23.
136. Qiao M, Murata K, Davis AR, Jeong SH, Liang TJ. Hepatitis C virus-like particles combined with novel adjuvant systems enhance virus-specific immune responses. *Hepatology* 2003; 37: 52-9.
137. Liu Q, Iackney C, Bhat RA, Prince AM, Zhang P. Regulated processing of hepatitis C virus core protein is linked to subcellular localization. *J Virol* 1997; 71: 657-62.
138. Yamanaka T, Ichida M, Doi I. Innate form of HCV core protein plays an important role in the localization and the function of HCV core protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 521-7.
139. Lo SY, Masiarz F, Hwang SB, Lai MM, Ou JH. Differential subcellular localization of hepatitis C virus core gene products. *Virology* 1995; 213: 455-61.
140. Suzuki R, Matsuura Y, Suzuki T, Ando A, Chiba J, Harada S, Saito I, Miyamura T. Nuclear localization of the truncated hepatitis C virus core protein with its hydrophobic C terminus deleted. *J Gen Virol* 1995; 76: 53-61.
141. Barba G, Harper F, Harada T, Kohara M, Goulinet S, Matsuura Y, Eder G, Schaff Z, Chapman MJ, Miyamura T, Brechot C. Hepatitis C virus core protein shows a cytoplasmic localization and associates to cellular lipid storage droplets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 1200-5.
142. Ray RB, Ray R. Hepatitis C virus core protein: intriguing properties and functional relevance. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 202: 149-56.
143. Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Steele R, Ray R. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res* 1995; 37: 209-20.
144. Chen SY, Kao CF, Chen CM, Shih CM, Hsu MJ, Chao CH, Wang SH, You LR, Lee YH. Mechanisms for inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 2003; 278: 591-607.
145. Srinivas RV, Ray RB, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein inhibits human immunodeficiency virus type 1 replication. *Virus Res* 1996; 45: 87-92.
146. Ray RB, Srinivas RV. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by a cellular transcriptional factor MBP-1. *J Cell Biochem* 1997; 64: 565-72.
147. Ray RB, Lagging LM, Meyer K, Ray R. Hepatitis C virus core protein cooperates with ras and transforms primary rat embryo fibroblasts to tumorigenic phenotype. *J Virol* 1996; 70: 4438-43.
148. Marusawa H, Hijikata M, Chiba T, Shimotohno K. Hepatitis C virus core protein inhibits Fas- and tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis via NF-kappaB activation. *J Virol* 1999; 73: 4713-20.
149. Zhu N, Khoshnan A, Schneider R, Matsumoto M, Dennert G, Ware C, Lai MM. Hepatitis C virus core protein binds to the cytoplasmic domain of tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 and enhances TNF-induced apoptosis. *J Virol* 1998; 72: 3691-7.
150. Kittlesen DJ, Chianese-Bullock KA, Yao ZQ, Braciale TJ, Hahn YS. Interaction between complement receptor gC1qR and hepatitis C virus core protein inhibits T-lymphocyte proliferation. *J Clin Invest* 2000; 106: 1239-49.
151. Matsumoto M, Hwang SB, Jeng KS, Zhu N, Lai MM. Homotypic interaction and multimerization of hepatitis C virus core protein. *Virology* 1996; 218: 43-51.
152. Nolandt O, Kern V, Muller H, Pfaffel, Theilmann L, Welker R, Krausslich HG. Analysis of hepatitis C virus core protein interaction domains. *J Gen Virol* 1997; 78: 1331-40.
153. Yan BS, Tam MH, Syu WJ. Self-association of the C-terminal domain of the hepatitis-C virus core protein. *Eur J Biochem* 1998; 258: 100-6.
154. Houghton M, Weiner A, Han J, Kuo G, Choo QL. Molecular biology of the hepatitis C viruses: implications for diagnosis, development and control of viral disease. *Hepatology* 1991; 14: 381-8.
155. Chen Z, Berkower I, Wang RY, Ching WM, Alter HJ, Shih JW. Genetic control of the murine humoral response to distinct epitopes of hepatitis C virus core protein. *J Viral Hepat* 1995; 2: 9-17.
156. Okamoto H, Tsuda F, Machida A, Munekata E, Akahane Y, Sugai Y, Mashiko K, Mitsui T, Tanaka T, Miyakawa Y, . Antibodies against synthetic oligopeptides deduced from the putative core gene for the diagnosis of hepatitis virus infection. *Hepatology* 1992; 15: 180-6.
157. Botarelli P, Brunetto MR, Minutello MA, Calvo P, Unutmaz D, Weiner AJ, Choo QL, Shuster JR, Kuo G, Bonino F. T-lymphocyte response to hepatitis C virus in different clinical courses of infection. *Gastroenterology* 1993; 104: 580-7.
158. Chisari FV. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest* 1997; 99: 1472-7.
159. Harris T. In *Genetic Engineering*. 1983.
160. Marston M. The purification of Eukaryotic polypeptides synthesized in *Escherichia coli*. *Bioch J* 1986; 240: 1-12.

161. Buckholz RG, Gleeson MA. Yeast system for the commercial production of heterologous proteins. *Biotechnology* 1991; 9: 1067-72.
162. Romanos MA, Scorec C A, Clare JJ. Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast* 1992; 8: 423- 88.
163. Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)* 1993; 11: 905-10.
164. Veenhuis M, van Dijken JP, Harder W. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeasts. *Adv Microb Physiol* 1983; 24: 1-82.
165. Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biotechnology (N Y)* 1993; 11: 905-10.
166. Valenzuela P, Medina A, Rutter WJ, Ammerer G, Hall BD. Synthesis and assembly of hepatitis B virus surface antigen particles in yeast. *Nature* 1982; 298: 347-50.
167. Cohen SN. Indications for hepatitis B vaccine. *JAMA* 1982; 248: 1310.
168. Hardy E, Martínez E, Diago D, Díaz R, González D, Herrera L. Large-scale production of recombinant hepatitis B surface antigen from *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology* 2000* 77- 157-67.
169. Muzio V, E.Pentón, M.Palou, G.Fontirrochi, M.Nazábal, M.J.González, A.Beldarrain, G.Padrón, V.Ramirez, A.Garcia, C.Ruiz, G.M.Izquierdo, L.Herrera, C.Duarte, J.García, J.de la Riva, L.Pérez. Method for the expression of heterologous genes in the yeast *Pichia pastoris*, expression vectors and transformed microorganisms. N° 912000742. 1991. *European patent application* .
170. Janowicz ZA, Melber K, Merckelbach A, Jacobs E, Harford N, Comberbach M, Hollenberg CP. Simultaneous expression of the S and L surface antigens of hepatitis B, and formation of mixed particles in the methylotrophic yeast, *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 1991; 7: 431-43.
171. Luschnig C, Hess M, Pusch O, Brookman J, Bachmair A. The gag homologue of retrotransposon Tyl assembles into spherical particles in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 1995; 228: 739-44.
172. Mastico RA, Talbot SJ, Stockley PG. Multiple presentation of foreign peptides on the surface of an RNA-free spherical bacteriophage capsid. *J Gen Virol* 1993; 74 (Pt 4): 541-8.
173. Crawford SE, Labbe M, Cohen J, Burroughs MH, Zhou YJ, Estes MK. Characterization of viruslike particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J Virol* 1994; 68: 5945-22.
174. Forstova J, Krauzewicz N, Wallace S, Street AJ, Dilworth SM, Beard S, Griffin BE. Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J Virol* 1993; 67: 1405-13.
175. Ruffing M, Zentgraf H, Kleinschmidt JA. Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *J Virol* 1992; 66: 6922-30.
176. French TJ, Marshall JJ, Roy P. Assembly of double-shelled, viruslike particles of bluetongue virus by the simultaneous expression of four structural proteins. *J Virol* 1990; 64: 5695-700.
177. Rosen E, Stapleton JT, McLinden J. Synthesis of immunogenic hepatitis A virus particles by recombinant baculoviruses. *Vaccine* 1993; 11: 706-12.
178. Le Cann P, Coursaget P, Iochmann S, Touze A. Self-assembly of human papillomavirus type 16 capsids by expression of the L1 protein in insect cells. *FEMS Microbiol Lett* 1994; 117: 269-74.
179. Touze A, Dupuy C, Chabaud M, Le Cann P, Coursaget P. Production of human papillomavirus type 45 virus-like particles in insect cells using a recombinant baculovirus. *FEMS Microbiol Lett* 1996; 141: 111-6.
180. Kajigaya S, Fujii H, Field A, Anderson S, Rosenfeld S, Anderson LJ, Shimada T, Young NS. Self-assembled B19 parvovirus capsids, produced in a baculovirus system, are antigenically and immunogenically similar to native virions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88: 4646-50.
181. Prasad BV, Rothnagel R, Jiang X, Estes MK. Three-dimensional structure of baculovirus-expressed Norwalk virus capsids. *J Virol* 1994; 68: 5117-25.
182. Fooks AR, Stephenson JR, Warnes A, Dowsett AB, Rima BK, Wilkinson GW. Measles virus nucleocapsid protein expressed in insect cells assembles into nucleocapsid-like structures. *J Gen Virol* 1993; 74 (Pt 7): 1439-44.
183. Delchambre M, Gheysen D, Thines D, Thiriart C, Jacobs E, Verdin E, Horth M, Bumy A, Bex F. The GAG precursor of simian immunodeficiency virus assembles into virus-like particles. *EMBO J* 1989; 8: 2653-60.
184. Fisher AJ, McKinney BR, Schneemann A, Rueckert RR, Johnson JE. Crystallization of viruslike particles assembled from flock house virus coat protein expressed in a baculovirus system. *J Virol* 1993; 67: 2950-3.
185. Mason HS, Arntzen CJ. Transgenic plants as vaccine production systems. *Trends Biotechnol* 1995, 13: 388-92.

186. Davis HL, Michel ML, Whalen RG. DNA-based immunization induces continuous secretion of hepatitis B surface antigen and high levels of circulating antibody. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1847-
187. Krausslich HG, Ochsenbauer C, Iraenkner AM, Mergener K, Facke M, Gelderblom HR, Bosch V. Analysis of protein expression and virus-like particle formation in mammalian cell lines stably expressing HIV-1 gag and env gene products with or without active HIV proteinase. *Virology* 1993; 192:605-17.
188. Hagensee ME, Yaegashi N, Galloway DA. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the L1 protein alone or by coexpression of the L1 and L2 capsid proteins. *J Virol* 1993; 67:315-22.
189. Inanaka S, Roy P. Identification of domains in bluetongue virus VP3 molecules essential for the assembly of virus cores. *J Virol* 1994; 68: 2795-802.
190. Taiman JD, Preston VG, Nicholson P, Elliott RM, Rixon FJ. Assembly of herpes simplex virus type I capsids using a panel of recombinant baculoviruses. *J Gen Virol* 1994; 75 (Pt 5): 1101-13.
191. Loparev VN, Araslanov RR, Mitina IV, Antonova TP, Ivanova NN, Iashina TL, Chemos VI. [Synthesis of hepatitis B virus core antigen (HBcAg) particles by recombinant vaccinia virus]. *Mol Gen Mikrobiol Virusol* 1990; 18-22.
192. Brookes SM, Sun H, Dixon LK, Parkhouse RM. Characterization of African swine fever virion proteins j5R and j13L: immuno-localization in virus particles and assembly sites. *J Gen Virol* 1998- 79 (Pt 5): 1179-88.
193. Iyengar S, Shah KV, Kotloff KL, Ghim SJ, Viscidi RP. Self-assembly of in vitro-translated human papillomavirus type 16 L1 capsid protein into virus-like particles and antigenic reactivity of the protein. *Clin Diagn Lab Immunol* 1996; 3: 733-9.
194. Wideroff L, Schiffman MH, Hoover R, Tarone RE, Nonnenmacher B, Hubbert N, Kimbauer R, Greer CE, Lorincz AT, Manos MM, Glass AG, Scott DR, Sherman ME, Buckland J, Lowy D, Schiller J. Epidemiologic determinants of seroreactivity to human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in cervical HPV-16 DNA-positive and-negative women. *J Infect Dis* 1996; 174: 937-43.
195. Schirmbeck R, Melber K, Kuhrober A, Janowicz ZA, Reimann J. Immunization with soluble hepatitis B virus surface protein elicits murine H-2 class I-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocyte responses in vivo. *J Immunol* 1994; 152: 1110-9.
196. Iwarson S, Tabor E, Thomas HC, Snoy P, Gerety RJ. Protection against hepatitis B virus infection by immunization with hepatitis B core antigen. *Gastroenterology* 1985; 88: 763-7.
197. Bertling WM, Gareis M, Paspaleeva V, Zimmer A, Kreuter J, Nürnberg E, Harrer P. Use of liposomes, viral capsids, and nanoparticles as DNA carriers. *Biotechnol Appl Biochem* 1991; 13: 390-405.
198. Haynes JR, Cunningham J, von Seefried A, Lennick M, Garvlin RT, Shen S-H. Development of a genetically-engineering, candidate polio vaccine employing the self-assembling properties of the tobacco mosaic virus coat protein. *Biotechnology* 1986; 4: 637-41.
199. Michel ML, Pontisso P, Sobczak E, Malpica Y, Streeck RE, Tiollais P. Synthesis in animal cells of hepatitis B surface antigen particles carrying a receptor for polymerized human serum albumin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1984; 81: 7708-12.
200. Borisova G, Arya B, Dislers A, Borschukova O, Tsibinogin V, Skrastina D, Eldarov MA, Pumpens P, Skryabin KG, Grens E. Hybrid hepatitis B virus nucleocapsid bearing an immunodominant region from hepatitis B virus surface antigen. *J Virol* 1993; 67: 3696-701.
201. Ulrich R, Borisova GP, Gren E, Berzin I, Pumpen P, Eckert R, Ose V, Siakkou H, Gren EJ, von Baehr R. Immunogenicity of recombinant core particles of hepatitis B virus containing epitopes of human immunodeficiency virus 1 core antigen. *Arch Virol* 1992; 126: 321-8.
202. Francis MJ, Hastings GZ, Brown AL, Grace KG, Rowlands DG, Brown DJ, Clarke BE. Immunological properties of hepatitis B core antigen fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87: 2545-9.
203. Griffiths JC, Harris SJ, Layton GT, Berrie EL, French TJ, Burns NR, Adams SE, Kingsman AJ. Hybrid human immunodeficiency virus Gag particles as an antigen carrier system: induction of cytotoxic T-cell and humoral responses by a Gag:V3 fusion. *J Virol* 1993; 67: 3191-8.
204. Morales J, Viña A, Garcia C, Acosta-Rivero N, Dueñas-Carrera S, Garcia O, Guerra I, Falcon V. Sequences derived from the genome of the hepatitis C virus, and use thereof. WO 98/25960 1998.
205. Herrera AM, Rodriguez EG, Hernandez T, Sandez B, Duarte CA. A family of compact plasmid vectors for DNA immunization in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279: 548o 1.
206. Sambrook J, E.F.Fritsch, T.Maniatis. *Cloning: a laboratory¹ manual (secondedition)*. Cold Spring Harbor Laboratory ed. Cold Spring Harbor, New York: 1989.

207. Bronson L, Parker R. The neutralization of vaccine virus by immune serum: titration by the intracerebral inoculation of mice. *J Bacteriol* 1941; 41: 56-7.
208. I thoughten RA, DeGraw ST, Bray MK, Hoffmann SR, Frizzell ND. Simultaneous Multiple Peptide Synthesis: The Rapid Preparation of Urge Numbers of Discrete Peptides for Biological Immunological, and Methodological Studies. *Biotechniques* 1986; 4: 522-6.
209. Tam .IP, Heath WF, Merrifield RB. S_N2 deprotection of synthetic 'peptides with a low concentration of HF in dimethyl sulfide: evidence and application in peptide synthesis. *J Am Chem Soc* 1983- 105:6442-55.
210. Lorenzo LJ, García O, Acosta-Rivero N, Dueñas-Carreara S, Martínez G, Alvarez-Obregon JC, Pichardo D, Ramos A, Guerra I, Morales J. Expression and immunological evaluation of the *Escherichia Coli*-derived hepatitis C virus envelope E1 protein. *Biotechnol Appl Biochem* 2000- 32- 137-43.
211. Sinha ND, J.Biemat, J.McManus, H.Koster. Polymer support oligonucleotide synthesis XVIII. use of cyanoethyl, N, N dialkylamino -N-morpho-linophosphoramidite of deoxynucleosides for the synthesis of DNA fragments simplifying deprotection and isolation of the final product. *Nucleic Acids Res* 1984; 12: 4539.
212. Martínez E, García C, Grillo JM. Rapid transformation of non-Saccharomyces yeast by electroporation. *Biotechnology Techniques* 1993; 7: 895-6.
213. Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 1975; 98: 503.
214. Sanger F, S.Nicklen, A.R.Couison. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463.
215. Tabor S, C.C.Richardson. DNA sequence analysis with a modified bacteriophage T7 DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 4767.
216. Saiki RK, D.H.Gelfand, S.Stoffel, S.J.Scharf, R.Higuchi, G.T.Hom, K.B.Mullis, H.A.Erlich. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 1988; 230: 487.
217. Takahashi K, Kishimoto S, Yoshizawa H, Okamoto H, Yoshikawa A, Mishiro S. p26 protein and 33-nm particle associated with nucleocapsid of hepatitis C virus recovered from the circulation of infected hosts. *Virology* 1992; 191: 431-4.
218. Smith PK, R.L.Krohn, G.T.Hermanson, A.K.Mallia, F.H.Gartner, M.D.Provenzano, E.K.Fujimoto, N.M.Goeke, B.J.Olson, D.C.Kienk. Measurement of protein using bicinchoninic acid [published erratum appears in *Anal Biochem* 1987 May 15;163(1):279], *Anal Biochem* 1985; 150: 76.
219. Lowry OH, N.J.Rosebrough, A.L.Farr, R.J.Randall. Protein measurement with the Follin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265.
220. Falcon V. CIGB, Expresión de antígenos de dos virus hepatotrópicos en hepatocitos y en cepas de la levadura *Pichia pastoris* transformada. Universidad de la Habana. Tesis. 2000.
221. Falcón V, Acosta-Rivero N, China G, Gavilondo J, de la Rosa M-C, Menéndez I, Dueñas-Carrera S, Viña A, García W, Gra B, Noa M, Reytor E, Barceló M-T, Alvarez F, Morales-Grillo J. Ultrastructural evidences of HCV infection in hepatocytes of chronically HCV-infected patients. *BBRC* 2003; 305: 1085-90.
222. Zuckerman A. Viral hepatitis and test for the Australia (hepatitis-associated) antigen and antibody. *Bull W:H:0* 1970;42:975-92.
223. Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680.
224. Towbin H, J.Gordon. Immunoblotting and dot immunobinding - current status and outlook (Review article). *J Immunol Methods* 1984; 72: 313.
225. de Felice M, M.C.Turco, P.C.Giarruso, L.Corbo, R.Pizzano, V.Martinelli. Differential regulator) role of monomorphic and polymorphic determinants of histocompatibility leukocyte antigens class 1 antigens in monoclonal antibody OKT3/induced T cell proliferation. *J Immunol* 1987; 139: 68.v
226. Kundig TM, Bachmann MF, Oehen S, Hoffmann UW, Simard JJ, Kalberer CP, Pircher H, Ohashi PS, Hengartner H, Zinkernagel RM. On the role of antigen in maintaining cytotoxic T-cell memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 9716-23.
227. Steel RGD, J.H.Torrie. *Bioestadística: Principios y procedimientos*. 1988.
228. Sigarroa A. *Biometriay diseño experimental*. 1985.
229. Martínez E, Morales J, Aguiar J, Pineda Y, Izquierdo M, Ferbeire G. Cloning and expression of hepatitis B surface antigen in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *Boptech Lett* 1992, 14. 83-6.
230. Bertolini L, Iacovacci S, Ponzetto A, Gorini G, Battaglia M, Carloni G. The human bone-marrow-derived B-cell line CE, susceptible to hepatitis C virus infection. *Res Virol* 1993; 144: 281-5.

231. Iacovacci S, Bertolini L, Manzin A, Valli MB, Battaglia M, Ponzetto A, Clementi M, Carloni G Quantitation of hepatitis C virus RNA production in two human bone marrow-derived B-cell lines infected in vitro. *Res Virol* 1997; 148: 147-51.
232. Iacovacci S, Manzin A, Barca S, Sargiacomo M, Serafino A, Valli MB, Macioce G, Hassan HJ Ponzetto A, Clementi M, Peschle C, Carloni G. Molecular characterization and dynamics of hepatitis C virus replication in human fetal hepatocytes infected in vitro *Hepatology* 1997; 26: 1328-37.
233. Ito T, Mukaigawa J, Zuo J, Hirabayashi Y, Mitamura K, Yasui K. Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. *J Gen Virol* 1996; 77: 1043-54.
234. Lanford RE, Sureau C, Jacob JR, White R, Fuerst TR. Demonstration of in vitro infection of chimpanzee hepatocytes with hepatitis C virus using strand-specific RT/PCR *Virology* 1994; 202: 606-14.
235. Serafino A, Valli MB, Andreola F, Crema A, Ravagnan G, Bertolini L, Carloni G. Suggested role of the Golgi apparatus and endoplasmic reticulum for crucial sites of hepatitis C virus replication in human lymphoblastoid cells infected in vitro. *J Med Virol* 2003; 70: 31-41.
236. Shimizu YK, Iwamoto A, Hijikata M, Purcell RH, Yoshikura H. Evidence for in vitro replication of hepatitis C virus genome in a human T-cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 5477-81.
237. Sugrue RJ, Fu J, Howe J, Chan YC. Expression of the dengue virus structural proteins in *Pichia pastoris* leads to the generation of virus-like particles. *J Gen Virol* 1997; 78 (Pt 8): 1861-6.
238. Yamaguchi M, Miyatsu Y, Horikawa Y, Sugahara K, Mizokami H, Kawase M, Tanaka H. Dynamics of hepatitis B virus core antigen in a transformed yeast cell: Analysis with an inducible system. *Journal of Electron Microscopy* 1994; 43: 386-96.
239. Rothstein RJ. One step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol* 1983; 202.
240. Cregg JM, K.R.Madden, K.J.Barringer, G.Thill, C.A.Stillman. Functional characterization of the two alcohol oxidase genes from the yeast *Pichia pastoris*. *Mol Cell Biol* 1989; 9: 1316.
241. Meunier JC, Fournillier A, Choukhi A, Cahour A, Cocquerel L, Dubuisson J, Wychowski C. Analysis of the glycosylation sites of hepatitis C virus (HCV) glycoprotein E1 and the influence of E1 glycans on the formation of the HCV glycoprotein complex. *J Gen Virol* 1999; 80: 887-96.
242. Fournillier JA, Cahour A, Escriou N, Girad M, Wychowski C. Processing of the E1 glycoprotein of hepatitis C virus expressed in mammalian cells. *J Gen Virol* 1996; 77 (Pt 5): 1055-64.
243. Dubuisson J. Folding, assembly and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins. *Cun- Top Microbiol Immunol* 2000; 242:135-48.: 135-48.
244. Miyamoto H, Okamoto H, Sato K, Tanaka T, Mishiro S. Extraordinarily low density of hepatitis C virus estimated by sucrose density gradient centrifugation and the polymerase chain reaction. *J Gen Virol* 1992; 73:715-8.
245. Zlotnick A, Cheng N, Conway JF, Booy FP, Steven AC, Stahl SJ, Wingfield PT. Dimorphism of hepatitis B virus capsids is strongly influenced by the C-terminus of the capsid protein. *Biochemistry* 1996; 35: 7412-21.
246. Tellinghuisen TL, Hamburger AE, Fisher BR, Ostendorp R, Kuhn RJ. In vitro assembly of alphavirus cores by using nucleocapsid protein expressed in *Escherichia coli*. *J Virol* 1999; 73: 5309-19.
247. Bothner B, Schneemann A, Marshall D, Reddy V, Johnson JE, Siuzdak G. Crystallographically identical virus capsids display different properties in solution. *Nat Struct Biol* 1999; 6: 114-6.
248. Rice CM. Flaviviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN KDHP, ed. *Virology*. 1996;931-59.
249. Miyamura T. Characterization of hepatitis C virus core protein. *Princess Takamatsu Svmp* 1995; 25:93-7.: 93-7.
250. Handschuh G, Caselmann WH. Bacterial expression and purification of hepatitis C virus capsid proteins of different size. *J Hepatol* 1995; 22: 143-50.
251. Handschuh G, Caselmann WH. Bacterial expression and purification of hepatitis C virus capsid proteins of different size. *J Hepatol* 1995; 22: 143-50.
252. Khanna A, Ray R. Hepatitis C virus core protein: synthesis, affinity purification and immunoreactivity with infected human sera. *Gene* 1995; 153: 185-9.
253. Acosta-Rivero N, Sanchez JC, Morales J. Improvement of human interferon HUIFNalpha2 and HCV core protein expression levels in *Escherichia coli* but not of HUIFNalphaS b> usinL, the tRNA(AGA/AGG). *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 296: 1303-9.
254. Khudyakov YE, Fields HA, Favorov MO, Khudyakova NS, Bonafonte M T, Holloway B Synthetic gene for the hepatitis C virus nucleocapsid protein. *Nucleic Acids Res* 1993. 21. -747 5

255. Koziel MJ. The role of immune responses in the pathogenesis of hepatitis C virus infection *J Viral Hepat* 1997; 4 Suppl 2:31-41.: 31-41.
256. Pawlita M, Muller M, Oppenlander M, Zentgraf H, Herrmann M. DNA encapsidation by viruslike particles assembled in insect cells from the major capsid protein VP1 of B-lymphotropic papovavirus. *J Virol* 1996; 70: 7517-26.
257. Fan Z, Yang QR, Twu JS, Sherker AH. Specific in vitro association between the hepatitis C viral genome and core protein. *J Med Virol* 1999; 59: 131-4.
258. Harase I, Moriyama T, Kaneko T, Kita H, Nomura M, Suzuki G, Ohnishi H, Muto Y, Yazaki Y, Imawari M. Immune response to hepatitis C virus core protein in mice. *Immunol Cell Biol* 1995; 73: 346-52.
259. Bode JG, Ludwig S, Ehrhardt C, Albrecht U, Erhardt A, Schaper F, Heinrich PC, Haussinger D. IFN-alpha antagonistic activity of HCV core protein involves induction of suppressor of cytokine signaling-3. *FASEB J* 2003; 17: 488-90.
260. Large MK, Kittlesen DJ, Hahn YS. Suppression of host immune response by the core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *J Immunol* 1999; 162: 931-8.
261. Soguero C, Joo M, Chianese-Bullock KA, Nguyen DT, Tung K, Hahn YS. Hepatitis C virus core protein leads to immune suppression and liver damage in a transgenic murine model. *J Virol* 2002; 76: 9345-54.
262. Yao ZQ, Ray S, Eisen-Vandervelde A, Waggoner S, Hahn YS. Hepatitis C virus: immunosuppression by complement regulatory pathway. *Viral Immunol* 2001; 14: 277-95.
263. Moorman JP, Prayther D, McVay D, Hahn YS, Hahn CS. The C-terminal region of hepatitis C core protein is required for Fas-ligand independent apoptosis in Jurkat cells by facilitating Fas oligomerization. *Virology* 2003; 312: 320-9.
264. MacDonald AJ, Duffy M, Brady MT, McKiernan S, Hall W, Hegarty J, Curry M, Mills KH. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J Infect Dis* 2002; 185: 720-7.
265. Abbas A, Lichtman A, Pober J. *Cellular and Molecular Immunology*. W. B. Saunders Company . 3er editon, 1997.
266. Taura Y, Fujiyama S, Kawano S, Sato S, Tanaka M, Goto M, Chikazawa H, Shibata J, Mizuno K, Sato T. Clinical evaluation of titration of hepatitis C virus core antibody and its subclasses. *J Gastroenterol Hepatol* 1995; 10: 270-6.
267. Kakimi K, Kuribayashi K, Iwashiro M, Masuda T, Sakai M, Ling W, Kubo Y, Kobayashi H, Higo K, Seki M. Hepatitis C virus core region: helper T cell epitopes recognized by BALB/c and C57BL/6 mice. *J Gen Virol* 1995; 76: 1205-14.
268. Diepolder HM, Gerlach JT, Zachoval R, Hoffmann RM, Jung MC, Wierenga EA, Scholz S, Santantonio T, Houghton M, Southwood S, Sette A, Pape GR. Immunodominant CD4+ T-cell epitope within nonstructural protein 3 in acute hepatitis C virus infection. *J Virol* 1997; 71: 6011-9.
269. Alvarez-Obregon JC, Dueñas-Carrera S, Valenzuela C, Grillo JM. A truncated HCV core protein elicits a potent immune response with a strong participation of cellular immunity components in mice. *Vaccine* 2001; 19: 3940-6.
270. Murata K, Lechmann M, Qiao M, Gunji T, Alter HJ, Liang TJ. Immunization with hepatitis C viruslike particles protects mice from recombinant hepatitis C virus-vaccinia infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003.
271. Kunkel M, Lorinczi M, Rijnbrand R, Lemon SM, Watowich SJ. Self-assembly of nucleocapsid-like particles from recombinant hepatitis C virus core protein. *J Virol* 2001; 75: 2119-29.
272. Mail lard P, Krawczynski K, Nitkiewicz J, Bronnert C, Sidorkiewicz M, Gounon P, Dubuisson J, Faure G, Crainic R, Budkowska A. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J Virol* 2001; 75: 8240-50.
273. Alvarez-Lajonchere L, Dueñas-Carrera S, Vina A, Ramos T, Pichardo D, Morales J. Additives an protein-DNA combinations modulate the humoral immune response elicited by a hepatitis C \irus core-encoding plasmid in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97:95-9.
274. Dueñas-Carrera S. CIGB, Inmunogenicidad de vacunas de ADN contra el VHC. Universidad de la Habana. Tesis 2002.

8 AUTOBIBLIOGRAFÍA RELACIONADA CON LA TESIS

LOGROS, PATENTES, PUBLICACIONES Y EVENTOS RELACIONADOS CON LA TESIS

Premio anual de la Academia de Ciencias de Cuba 2001

Nelson Acosta Rivero, Santiago Dueñas Carrera, Juan Morales Grillo, Julio C. Alvarez, Julio C. Aguilar, Ivis Guerra, Viviana Falcon, Alexis Musacchio, y col. Ensamblaje de la proteína cápsida de VHC en partículas semejantes a virus y sus aplicaciones.

Patente

Juan Morales, Ariel Viña, Ciro García, Mario Barro, Odalis García, Ivis Guerra, Nelson Acosta Rivero, Santiago Dueñas Carrera, Viviana Falcón. Secuencias de ADNc derivadas del genoma del virus de la hepatitis C y su uso. Oficina Cubana de Patentes; 1996/119.

Publicaciones

1. Acosta-Rivero, N., Falcon, V., Alvarez, C., Musacchio, A., China, G., de la Rosa, M. C., Rodriguez, A., Dueñas-Carrera, S., Tsutsumi, V., Shibayama, M., Menéndez, I., Luna-Munoz, J., Miranda-Sanchez, M. M., Kouri, J., Morales, J. Structured HCV nucleocapsids composed of P21 core protein assemble primarily in the nucleus of *P. pastoris* yeast (2003) *Biochem Biophys Res Commun.* 309, 48-53.
2. Falcon, V., Acosta-Rivero, N., China, G., Gabilondo, J., de la Rosa, M. C., Menéndez, I., Dueñas-Carrera, S., Gra, V., Rodriguez, A., Tsutsumi, V., Kouri, j., Shibayama, M., Noa M., and Morales-Grillo, J. Nuclear localization of nucleocapsid-like particles and HCV core protein in hepatocytes of a chronically HCV-infected patient. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* 309, 54-59.
3. Acosta-Rivero N, Musacchio A, Lorenzo L, Alvarez C, Morales J. Processing of the Hepatitis C virus precursor protein expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295:81-84.
4. Acosta-Rivero N, Alvarez-Obregon JC, Musacchio A, Falcon V, **Duenas-Carrera**

- S, Marante J, Menendez I, Morales J. In vitro self-assembled VHC cápsida viruslike particles induces strong humoral immune response in sheep. *Biochem Biophys Res Commun* 2002 Jan 11;290(1):300-4.
5. Acosta-Rivero N, Aguilar JC, Musacchio A, Falcon V, Vina A, de la Rosa MC, Morales J. Characterization of the VHC cápsida virus-like particles produced in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001 Sep 14;287(1):122-5.
 6. Lorenzo LJ, Dueñas-Carrera S, Falcon V, Acosta-Rivero N, Gonzalez E, de la Rosa MC, Menendez I, Morales J. Assembly of Truncated VHC Cápsida Antigen into Virus-like Particles in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;281(4):962-965.
 7. Santiago Dueñas-Cabrera, Juan Morales, Nelson Acosta-Rivero, Lazaro J Lorenzo, Ciro Garcia, Thelvia Ramos, Ivis Guerra, Maxlenin Peña. Variable level expression of hepatitis C virus cápsida protein in a prokaryotic system. Analysis of the humoral response in rabbit. *Biotechnología Aplicada* 1999 Vol. 16, No. 4.

Eventos Nacionales e Internacionales

1. Latinoamerican Congress of Tropical Medicine. May, 1997. Tropical Medicine Institute, Havana, Cuba., (presentación oral) "Expression of the hepatitis C cápsida virus protein in *E.coli*" Acosta, N., Garcia, C, Morales, J., Peña, M., Sanches, J.
2. Biotechnology HAVANA '99. December 1999 (Poster) In vitro Virus like particle assembly of the hepatitis C virus cápsida protein expressed in *Pichia pastoris*. (1999). Acosta-Rivero N, Falcón V, Manrique V, Aguilar J, Lorenzo L, Guerra A, Limonta A, Alvarez C, Paéz R, Garcia C, De la Rosa M, Menéndez I, Guerra I, Grillo J. Habana, Cuba.
3. **Sixth International Symposium on Positive Strand RNA Viruses (France 2001) (Poster)** Characterization of The Hepatitis C Virus cápsida-like particles that elicited a strong humoral immune response in Sheep. **Nelson Acosta-Rivero**, Viviana Falcón, Julio Cesar Aguilar, Julio Cesar Alvarez, Alexis Mussachio, V. Manrique, Lázaro Julio Lorenzo, MC. De la Rosa, Ivon Menéndez, Ariel Viña Rodríguez, and Juan Morales Grillo.

4. **Workshop on Vaccine Adjuvants (Havana 2001)**

(presentación oral) VHC cápsida antigen as a mucosal adyuvant. **Nelson Acosta- Rivero**, Julio C. Aguilar, Santiago Dueñas-Carrera, Viviana Falcón,, Alexis Mussachio, Ariel Viña, Liz Alvarez-Lajonchere, Jeny Marante, et al..

5. **International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses.** Paris 2001.

(Poster)Characterization of the hepatitis C virus cápsida-like particles produced in the methylotrophic yeast *Phichia pastoris*. Juan Morales Grillo, Nelson Acosta Rivero, Julio Cesar Aguilar, Julio Cesar Alvarez, Alexis Mussachio, Viviana Falcón, Ariel Viña.



9 ANEXO

9.1 Anexo 1

Secuencia de las variantes del gen *CoEl* clonadas

```
5'-TCAGGATCCATG AGC ACG AAT CCT AAA CCT CAA AGA AAA ACC AAA CGT AAC ACC AAC
CGC CGC CCA CAG GAC GTC AAG TTC CCG GGC GGT GGT CAG ATC GTT GGT GGA GTT TAC
CTG TTG CCG CGC AGG GGC CCC AGG TTG GGT GTG CGC GCA ACT AGG AAG ACT TCC GGG
CGG TCG CAA CCT CGT GGA AGG CGA CAA CCT ATC CCC AAG GCT CGC GGG CCC GAG GGC
AGG TCC TGG GCC CAG CCC GGG TAG CCT TGG CCC CTC TAT GGT AAC GAG GGC ATG GGA
TGG GCA GGA TGG CTC CTG TCA CCC CGT GGC TCT CGG CCT AGT TGG GGC CCC ACT GAC
CCC CGG CGT AGG TCG CGT AAT TTG GGT TAATAGAATTCTCA-3'
```

Secuencia nucleotídica del fragmento de 360 pb que contiene el gen *CoI20* clonado en plasmidio pSILCoI20. NNNNNN indica las regiones de homología de los oligonucleótidos 2161+, 1305-, 1025+ y 2162-, en este orden con el gen *CoI20*, así como los sitios de restricción BamHI (GGATCC) y EcoRI (GAATTC)

5.

```
TCAGCTAGATGA <5' GAATTC> AAACCTCAAAGAAAAACCAAACGTAACACCAACCGCCGCC
CACAGGACGTCAAGTTCCCGGGCGGTGGTCAGATCGTTGGTGGAGTTTACCTGTTGCCGCGCAG
GGGCCCCAGGTTGGGTGTGCGCGCAACTAGGAAGACTTCCGAGCGGTGCGAACCTCGTGGAAG
GCGACAACCTATCCCCAAGGCTCGCCGGCCGAGGGCAGGTCCTGGGCCAGCCCGGTAAGG
TGGCCCCCTATGGTAACCAACCGCATGGGATGGGCAGGATGGCTCCTGTCAACCCGTTGGCTCTC
GGCCTAGTTGGGGCCCCACTGACCCCGGGCGTACCTGCGCTAATTTGGCTAAGGTCATCGATAC
CCTCACATGCGGCTTCGCCGACCTCATGGGGTACATTCCGCTCGTCGGCGCCCCCTAGGGGGC
GCTGCCAGGGCCCTGGCGCATGGCGTCCGGGTCTGGAGGACGGCGTGAATTATGCAACAGGG
AATCTGCCCGGTTGCTCTTTCTCTCTCTTTTGGCTTTGCTGTCTGTTGACCATCCCAGTTT
CCGCCTATGAAGTGCACAACGCGTCCGGGGTGTACCATGTCACCAACGACTGCTCCAACCTCAAG
CATTGTGTATGAGGCAGACGACATGATCATGCACACCCCGGATGCGTGCCTGCGTTCCGGGAG
GACAACACCTCCCGCTGCTGGGTAGCGCTCACCCACACTCGCGGCCAGGAATGCCAGCGTCC
CCACCAGACAATACGACGCCACGTCGATTTGCTCGTTGGGGCGGCTGCTCTCTGCTCCGCTAT
GTACGTGGGGGATCTCTGCGGATCTGTTTCCCTCGTTTCCAGCTGTTACCTTCTCGGCTCGCCG
GCATGAGACAGCACAGGACTGCAACTGCTCAATCTATCCCGGCCAGTATCAGGTCACCGCATG
GCCTGGGATATGATGATGAACCTGGTCACCTTCAACAGCCCTAGTGGTATCGCACTTACTCCGGAT
TAAGCATTGCC-3'
```

Secuencia nucleotídica del fragmento de 1017 pb que contiene el gen *CoEl* clonado en plasmidio pNAO.CoEl.340. NNNNNN indica las regiones de homología de los oligonucleótidos 1965+, 1305-, 1025+, 1966-, 1852+, 1835+ y 2064+ en este orden con el gen *CoEl*.