

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“Diseño de un péptido sintético capaz de
bloquear la infección por HSV-1 y HSV-2 *in
vitro*”**

TESIS

QUE COMO UNO DE LOS REQUISITOS PARA
OBTENER EL GRADO DE: **MAESTRO EN CIENCIAS
QUIMICOBIOLOGICAS.**

PRESENTA

QBP JESÚS MIGUEL TORRES FLORES

Junio 2009



El sustentante fue becario CONACYT durante el periodo Agosto 2007 - Julio 2009y becario PIFI en los proyectos SIP 20070174 Y SIP 20080027.

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Virología departamento de Microbiología de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas bajo la dirección de la Dra. Blanca L. Barrón Romero y la codirección del Dr. Alfonso Méndez Tenorio, con apoyo económico de los proyectos:

SIP-IPN 2007074

SIP-IPN 22080027

ICyTDF-IPN 2008

"Para lograr grandes cosas, se debe no sólo actuar, sino también soñar; no sólo planear, sino también creer".

Anatole France (1844 - 1924)

Agradecimientos Profesionales

A la Dra. Blanca Lilia Barrón Romero por darme la oportunidad de desarrollar este proyecto en su laboratorio y por aportar los recursos y las ideas necesarias para completarlo con éxito.

Al Dr. Alfonso Méndez Tenorio por todo el conocimiento que compartió conmigo durante el desarrollo de este proyecto.

A mis sinodales por tomarse la molestia de leer esta tesis y por hacer comentarios y observaciones al respecto de la misma.

A la ENCB y al posgrado en Ciencias Quimicobiológicas.

Agradecimientos Personales

A mis padres por estar a mi lado durante toda mi maestría. Gracias por apoyarme en todo momento y por regalarme la oportunidad de seguir estudiando. Gracias por sus consejos y por todo lo que me han enseñado. SIN USTEDES NO SERÍA LO QUE SOY AHORA. Los amo.

A mi hermano... gracias por todo tu apoyo...

A mi abuela porque de no ser por ella tal vez no hubiera sido QBP. Al resto de mi familia. Eduardo, Ana Isabel y Blanca Cecilia, son los mejores primos que alguien puede tener.

A toda la familia Velasco Ureña. Gracias por estar ahí en los momentos difíciles. Gracias por abrirme las puertas de su casa. Los quiero muchísimo. Son como una familia más para mi. MIL GRACIAS POR TODO.

A Diego Velasco Ureña. Gracias por escucharme, por aguantarme y por estar ahí siempre. Por apoyarme y por ayudarme a ser una mejor persona. Cualquier cosa que pudiera escribir se quedaría corta.....

A mis amigas Emma y Rubi. Fue increíble lo que compartí con ustedes dos, las adoro y les agradezco su ayuda y su apoyo.

A Héctor Bautista Guerrero. Eres un hermano para mí. Aunque estés lejos tu apoyo es invaluable. MUCHAS GRACIAS AMIGO.

A Claudia Quesada López. Tu amistad es algo que valoro mucho. Gracias por estar ahí siempre para apoyarme en todo. Ya son años.. y los que faltan!!!

A Claudia Gómez. Mil gracias por tu amistad y por esas interminables pláticas acerca de la vida. Eres la onda ami!.

A mis amigos de toda la vida (PIERRE, MIGUEL, PRIS, ALE, ANA). Siempre han estado ahí cuando los he necesitado y se que ahí estarán siempre.

A mis amigos Aida y Néstor. Gracias por compartir a su familia conmigo. Es un placer tenerlos a los dos como amigos.

• ÍNDICE

	Página
RELACIÓN DE FIGURAS	v
RELACIÓN DE TABLAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix
INTRODUCCIÓN	1
I. La familia <i>Herpesviridae</i>	1
La subfamilia <i>Alphaherpesvirinae</i>	2
La subfamilia <i>Betaherpesvirinae</i>	2
La subfamilia <i>Gammaherpesvirinae</i>	3
II. Proceso de entrada de los herpesvirus	4
El proceso de adsorción	4
El reconocimiento a receptor	5
III. La fusión de membranas y las glicoproteínas virales de fusión	6
Las glicoproteínas virales de fusión Tipo I	8
Las glicoproteínas virales de fusión Tipo II	8
Las glicoproteínas virales de fusión Tipo III	9
IV. Las glicoproteínas efectoras de la fusión en los herpesvirus	10
La glicoproteína B	10
El heterodímero gH-gL	12
V. El proceso de fusión de membranas	13
VI. Los herpesvirus y los síndromes que producen	15
La subfamilia <i>Alphaherpesvirinae</i> y su patogénesis	16

ANTECEDENTES	20
I. Antivirales	20
II. Los péptidos antivirales	21
Péptidos que atraviesan membrana celular	21
Péptidos inhibidores de proteasas	22
Péptidos inhibidores de la fusión	22
JUSTIFICACIÓN	25
HIPÓTESIS	26
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS PARTICULARES	27
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	28
I. Esquema general	28
II. Diseño de los péptidos	28
III. Ensayos de toxicidad	29
IV. Ensayos de bloqueo sobre el virión	29
V. Ensayos de bloqueo conjunto	30
VI. Ensayos de bloqueo sobre las células	30
METODOLOGÍA	31
I. Propagación de células y virus	31
Descongelación de células Vero	31
Subcultivo de Células Vero	31
Propagación de HSV-1 y HSV-2 en células Vero	32

I.IV. Titulación viral	32
II. Diseño y síntesis de péptidos.	33
II.I. Obtención de secuencias de la glicoproteína H.	33
II.II. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de gH con T-Coffee	33
II.III. Obtención de los perfiles de hidrofobicidad de gH	34
II.IV. Determinación de las propiedades antigénicas de gH.	34
II.V. Determinación de la flexibilidad de cadena.	34
II.VI. Predicción de estructura secundaria con PSIPRED	35
II.VII. Alineamiento de estructuras secundarias	35
II.VIII. Determinación de carga de la gH	35
II.IX. Determinación de la estructura 3D de los péptidos	36
II.X. Síntesis de los péptidos	36
III. Ensayos de citotoxicidad	36
III.I. Propagación de células HepG2/C3A	36
III.II. Ensayos de citotoxicidad	37
III.III. Ensayo de reducción de MTT	38
IV. Ensayos de Bloqueo	38
IV.I. Sobre el virus	38
IV.II. Sobre la infección simultánea	40
IV.III. Sobre las células	41
 RESULTADOS	 43
 I I. Diseño, selección y síntesis de péptidos	 43
I.I. Obtención de los perfiles de hidrofobicidad y flexibilidad de la gH de HSV-1	43
I.II. Determinación de la estructura secundaria de gH con PSIPRED	46
I.III. Alineamiento de estructuras secundarias con Praline.	48
I.IV. Determinación de la carga de gH con el programa Charge	50

I.V. Selección de péptidos	51
II I.VI. Síntesis de péptidos	56
III. Ensayos de citotoxicidad	57
IV. Ensayos de bloqueo	60
IV.I. Bloqueo directo sobre el virión	60
IV.II. Ensayo de tratamiento conjunto	63
IV.III. Tratamiento sobre las células	66
IV.IV. Tratamiento con Aciclovir	67
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES	79
PERSPECTIVAS	80
BIBLIOGRAFÍA	81

RELACIÓN DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructura general de un herpesvirus.	2
Figura 2. Micrografía electrónica de algunos alphaherpesvirus	3
Figura 3. Proceso de entrada de un Herpes Simplex	5
Figura 4. Estructura de la hemaglutinina del virus de Influenza.	8
Figura 5. Estructura de la proteína E del virus del Dengue	9
Figura 6. Estructura de la glicoproteína G del virus de la estomatitis vesicular	10
Figura 7. Estructura de la glicoproteína B de HSV-1	11
Figura 8. Esquema general de la estructura secundaria y las propiedades hidropáticas de la gH de distintos herpesvirus.	14
Figura 9. Representación esquemática de la fusión de los herpesvirus.	15
Figura 10. Gráfica de los perfiles bioquímicos residuo por residuo de la gH de HSV-1.	44
Figura 11. Gráfica de los perfiles bioquímicos de la gH de HSV-1 por porciones de 15 residuos	45
Figura 12. Representación esquemática de la estructura secundaria del precursor de gH de HSV-1 determinada con PSIPRED	47
Figura 13. Alineamiento de la estructura secundaria de la gH de HSV-1 y HSV-2 con Praline	49
Figura 14. Gráfica de la determinación de la carga de gH de HSV-1 con el programa Charge	50
Figura 15. Predicción de la estructura tridimensional de los péptidos CB-3, CB-4, CB-5 y CB-6	55
Figura 16. Determinación de homólogos remotos para los péptidos CB-3, CB-4, CB-5 y CB-6 mediante el programa psi-Blast	56
Figura 17. Grafica de la citotoxicidad en células HepG2/C3A de los péptidos sintéticos CB-1, CB-2 y TNT.	58
Figura 18. Grafica de la citotoxicidad en células Vero de los péptidos sintéticos CB-1, CB-2 y TNT	59

Figura 19. Grafica del porcentaje de protección en contra de la infección por HSV-1 en la línea celular Vero debida a la acción directa sobre el virión de los péptidos CB-1, CB-2 y TNT	61
Figura 20. Grafica del porcentaje de protección en contra de la infección por HSV-2 en la línea celular Vero debida a la acción directa sobre el virión de los péptidos CB-1, CB-2 y TNT	62
Figura 21. Grafica del porcentaje de protección ejercida por los péptidos CB-1 y CB-2 y TNT en contra de la infección por HSV-1 por tratamiento conjunto (Virus-Péptidos-Células).	64
Figura 22. Grafica del porcentaje de protección ejercida por los péptidos CB-1, CB-2 y TNT en contra de la infección por HSV-2 por tratamiento conjunto (Virus-Péptidos-Células).	65
Figura 23. Grafica del porcentaje de protección ejercida por los péptidos CB-1, CB-2 y TNT en contra de la infección por HSV-1 por tratamiento previo de las células.	66
Figura 24. Grafica del porcentaje de protección ejercida por los péptidos CB-1, CB-2 y TNT en contra de la infección por HSV-2 por tratamiento previo de las células.	67
Figura 25. Grafica del porcentaje de protección ejercida por Aciclovir en contra de la infección por HSV-2 .	68

RELACIÓN DE TABLAS	Página
Tabla 1. Herpesvirus humanos y los distintos síndromes que provocan.	16
Tabla 2. Números de acceso de las secuencias de nucleótidos del genoma de HSV-1 y HSV-2 y de las secuencias de aminoácidos de la gH de cada uno de estos virus.	33
Tabla 3. Péptidos sintéticos seleccionados	53
Tabla 4. Características de los péptidos CB-1, CB-2 y TNT.	57

Resumen

Los virus del Herpes Simplex son virus neurotrópicos que producen diferentes síndromes clínicos en el humano. Las reactivaciones de estos virus y las complicaciones asociadas a ellas (encefalitis, infecciones neonatales, relación con HIV-1), así como la aparición de cepas de HSV-1 y HSV-2 resistentes a los antivirales que se emplean en la actualidad, hace indispensable el desarrollo de nuevas terapias específicas y eficaces en contra de las infecciones herpéticas. En este trabajo se planteó el desarrollo de una nueva terapia en contra de las infecciones herpéticas mediante el empleo de péptidos sintéticos. Se analizaron la hidrofobicidad, antigenicidad y flexibilidad de cadena de la gH de HSV-1 para buscar las regiones expuestas y flexibles de dicha glicoproteína. También se determinó la estructura secundaria de la gH de HSV-1 y HSV-2 para localizar aquellas regiones con estructura altamente conservada entre ambas glicoproteínas. Se diseñaron tres péptidos derivados de la glicoproteína H de HSV-1. Los péptidos sintéticos (CB-1, CB-2 y PAT) no mostraron niveles de toxicidad superiores al 20% en las líneas celulares HepG2/C3A y Vero y fueron capaces de bloquear la infección por HSV-1 y HSV-2 *in vitro*. Las concentraciones óptimas para la actividad de los péptidos van de 12.5 μM a 0.3 μM contra 100 TCID₅₀/ml y de 0.8 μM a 0.01 μM contra 50 TCID₅₀/ml. La eficiencia de los tres péptidos es comparable con la del compuesto antiviral Aciclovir. Dado que los blancos virales sobre los que actúan esos antivirales son distintos podrían utilizarse en terapia combinada reduciendo los efectos adversos del Aciclovir así como la selección de cepas resistentes.

Abstract

Herpes Simplex viruses are neurotropic viruses that can produce a wide range of clinical syndromes in humans. Complications associated with these viruses like encephalitis, neonatal infections and the onset of AIDS in HIV positive patients due to the replication of HSV-2 are a huge public health problem. The arising of HSV-1 and HSV-2 strains resistant to the antivirals commonly used makes the development of new antivirals an urgent task. The aim of this work was to design a novel antiviral therapy to inhibit the entry of HSV-1 and HSV-2 into their host cells. A search for the most exposed and flexible regions of the glycoprotein H of HSV-1 was performed by *in silico* hydrophobicity, antigenicity and chain flexibility determinations. Secondary structure predictions and alignments were carried out to find regions in the gH of both HSV-1 and HSV-2 with conserved secondary structure. Three peptides derived from the gH of HSV-1 were synthesized (CB-1, CB-2 and TNT) and tested for their cytotoxicity in HepG2/C3A and Vero cell lines showing toxicity levels under 20%. Concentrations ranging from 12.5 μM to 0.3 μM were able to inhibit the infection with 100 TCID₅₀/ml of both HSV-1 and HSV-2 with an efficiency between 80-100%. Concentrations ranging from 0.8 μM to 0.01 μM were efficient (more than 100%) against 50 TCID₅₀/ml of HSV-1 and HSV-2. The efficiency of the three peptides tested is comparable to the efficiency of the antiherpetic compound Acyclovir, this opens the possibility of using

INTRODUCCIÓN

I. La familia *Herpesviridae*

Según el International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) (Fauquet et al., 2005) la familia *Herpesviridae* (que incluye todos los herpesvirus cuyos hospederos principales son mamíferos) está clasificada dentro del orden Herpesvirales (Davison et al., 2009), en el cuál, también se encuentran clasificadas las familias *Alloherpesviridae* (que incluye aquellos herpesvirus cuyos hospederos principales son los peces) y la familia *Mallacoherpesviridae* (que incluye a los herpesvirus cuyos hospederos principales son moluscos).

Un virión clásico de un miembro de la familia *Herpesviridae* posee DNA de doble cadena (dsDNA) como material genético, éste se encuentra contenido dentro de una cápside icosaédrica compuesta por 162 capsómeros la cual mide de 100 a 110 nm de diámetro. Rodeando a la cápside presenta un material amorfo de composición proteica denominado tegumento el cual está rodeado por una envoltura membranosa en la que están embebidas diferentes glicoproteínas virales (Fig. 1) (Roizman y Pellet, 2007).

Con base en las propiedades biológicas del virión, el ICTV subdivide a la familia *Herpesviridae* en 3 subfamilias: *Alphaherpesvirinae*, *Betaherpesvirinae* y *Gammaherpesvirinae* (Büchen-Osmond, 2003; Davison et al., 2009).

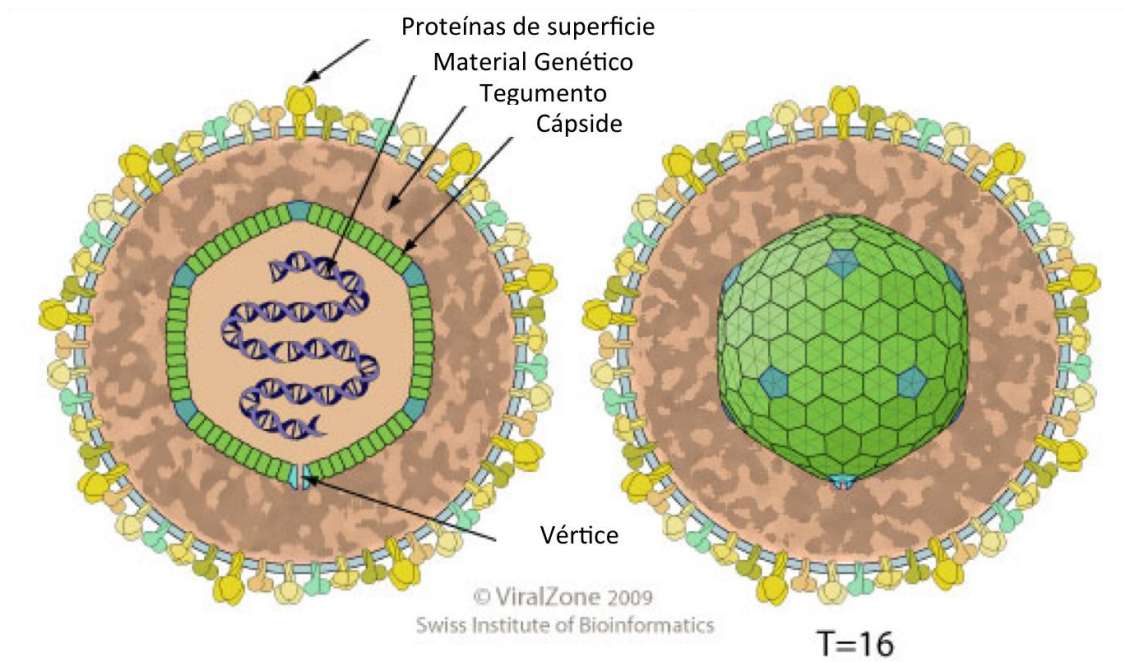


Figura 1. Estructura general de un herpesvirus. (modificada de http://www.expasy.org/viralzone/all_by_protein/230.html).

La subfamilia *Alphaherpesvirinae*

Los virus que pertenecen a la subfamilia *Alphaherpesvirinae* presentan una amplitud de hospederos variable, ciclos de replicación cortos que les permiten reproducirse rápidamente en cultivos celulares, además, poseen la capacidad de establecer latencia en ganglios sensoriales del Sistema Nervioso Central (SNC). Dentro de esta familia se encuentran los Herpes Simplex Virus 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2) y el Virus de la Varicela Zoster (VZV) entre otros (Fig. 2) (Roizman y Pellet, 2007).

La subfamilia *Betaherpesvirinae*

Los miembros de la subfamilia *Betaherpesvirinae* presentan una amplitud de hospederos restringido, sus ciclos de replicación son largos y la infección en cultivos celulares avanza lentamente; las células infectadas desarrollan citomegalia frecuentemente. Los virus de esta subfamilia establecen un estado

de latencia en tejido glandular principalmente. Dentro de esta familia se encuentran virus como el Citomegalovirus Humano (HCMV) y el Herpes Virus Humano Tipo 6 (HHV-6) (Roizman y Pellet, 2007).

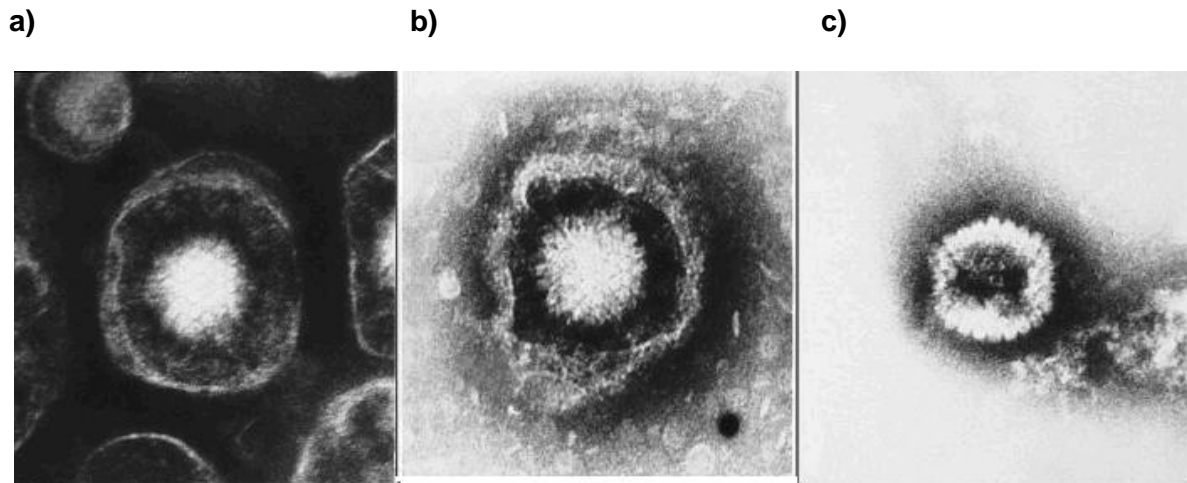


Figura 2. Micrografía electrónica de algunos alphaherpesvirus. a) HSV-1, b) HSV-2 y c) VZV (Fuente: CDC).

La subfamilia *Gammaherpesvirinae*

Los virus que integran la subfamilia *Gammaherpesvirinae* presentan un rango de hospedero limitado a la familia u orden al que pertenece el hospedero natural., Los miembros de esta subfamilia son oncogénicos y se replican en células linfoblastoides *in vitro* aunque también pueden provocar infecciones líticas en algunos tipos de células epitelioides y fibroblásticas. Los virus de esta subfamilia infectan específicamente linfocitos T ó B y son capaces de establecer latencia en tejido linfoide. Dentro de esta familia están incluidos el virus de Epstein Barr (EBV) y el Herpesvirus asociado a Sarcoma de Kaposi (HHV-8) (Roizman y Pellet, 2007).

II. Proceso de entrada de los herpesvirus

El proceso de adsorción

El proceso de entrada de los herpesvirus a su célula hospedera inicia con la adsorción del virus a la superficie celular. La adsorción se lleva a cabo mediante la unión reversible y no esencial (Spear y Longnecker, 2003) de ciertas glicoproteínas virales a moléculas de glucosa-amino-glucanos (GAG), principalmente a cadenas de heparán sulfato (Compuestas por unidades repetidas del disacárido GlcNAc-GlcA) que se encuentran unidas covalentemente a residuos de serina en proteoglicanos presentes en la cara externa de la membrana celular (Shukla y Spear, 2001; Spear, 2004).

HSV-1 y HSV-2 poseen dos glicoproteínas capaces de reconocer moléculas de heparán sulfato; la primera de estas es la glicoproteína C (gC) (Fig. 3), la cual está conservada en la mayoría de los virus neurotrópicos de la subfamilia *Alfaherpesvirinae* (Shukla y Spear, 2001; Spear, 2004). Existe un 65% de homología entre la gC de HSV-1 y HSV-2 (Swain, 1985) y se sabe que la gC de cada virus reconoce distintos tipos de heparán sulfato (Trybala, 1994; Gerber, 1995). La glicoproteína B (gB), es la otra glicoproteína viral capaz de reconocer moléculas de heparán sulfato (Fig. 3) (Herold et.al., 1994; Shukla y Spear, 2001) Esta glicoproteína está presente en todos los miembros de la familia *Herpesviridae* debido a que juega un papel sumamente importante durante la fusión de membranas como se mencionará mas adelante.

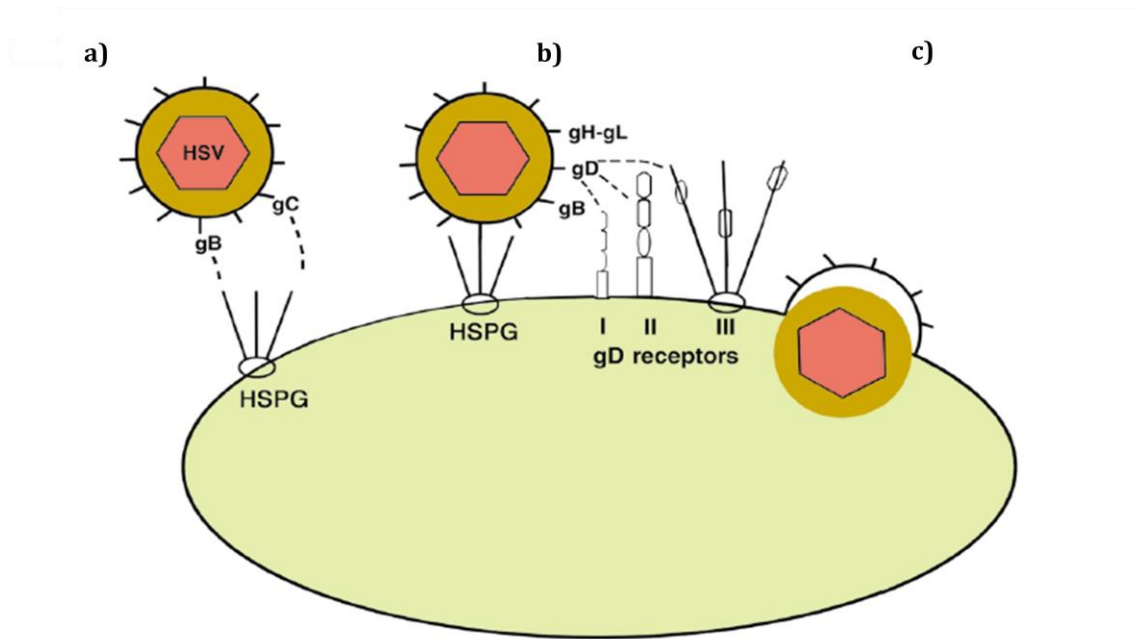


Figura. 3. Proceso de entrada de un Herpes Simplex. a) Adsorción mediada por las glicoproteínas virales gB y gC y moléculas de heparán sulfato presentes en proteoglicanos de la superficie celular (HSPG). b) Reconocimiento de gD a uno de los tres tipos diferentes de receptores celulares (I,II,III). c) Fusión de membranas mediada por las glicoproteínas virales efectoras de la fusión (Spear ,2004).

El reconocimiento a Receptor

Una vez que se dio el contacto inicial herpesvirus-célula (mediado por moléculas de heparán sulfato y por las glicoproteínas virales gC y gB), se presenta el reconocimiento y la unión entre ciertas glicoproteínas virales y su receptor celular el cual se denomina receptor de entrada. A la fecha, se conocen tres clases de receptores de entrada para los herpes simplex 1 y 2; las nectinas 1 y 2 que pertenecen a la superfamilia de las inmunoglobulinas, el Herpes Virus Entry Mediator (HVEM) que pertenece a la familia de receptores del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) y por último, sitios específicos en moléculas de heparán sulfato generados por una reacción catalizada por enzimas llamadas 3-O-sulfotransferasas. Esta reacción agrega grupos sulfato a la posición 3-OH de algunos residuos de N-acetil glucosamina (Spear, 2000; Spear, 2004; Pertel et al., 2001; Browne et al., 2001). Todos los receptores de entrada antes mencionados son reconocidos por la glicoproteína viral gD, la

cual posee diferentes dominios de unión para cada uno de ellos (Krummenacher, 1999; Krummenacher, 2000; Conolly, 2002; Conolly, 2003).

La glicoproteína D de HSV-1 unida a uno de sus receptores de entrada, el HVEM, fue cristalizada en 2001 por Carfi et al., En el año de 2005, Krummenacher et al., cristalizaron la gD, también de HSV-1, en su forma inactiva, es decir, no unida a su ligando y se observó que existen diferencias significativas en la estructura de la gD inactiva con respecto a su estructura unida al ligando. Con esto se demostró que la glicoproteína D sufre cambios conformacionales al momento de unirse a cualquiera de sus receptores de entrada (Krummenacher, 2005; Carfi, 2001). La gD de HSV-1 posee además, un dominio rico en prolina cerca de la región transmembranal, dicha región es de suma importancia durante la fusión ya que esta región es capaz de interactuar con las proteínas efectoras de la fusión de membranas (Cocchi et al., 2004).

III. La fusión de membranas y las glicoproteínas virales de fusión.

La fusión de membranas es uno de los principales mecanismos utilizados por los virus envueltos, entre ellos los miembros de la familia *Herpesviridae*, para entrar a su célula hospedera. Dicho mecanismo puede ocurrir directamente sobre la membrana plasmática ó bien, dentro de estructuras celulares especializadas como los endosomas cuando los virus son endocitados por su célula hospedera. El mecanismo de fusión involucra un gran número de receptores celulares distintos, los cuales son reconocidos por un grupo de proteínas especializadas encargadas de efectuar la fusión conocidas como

glicoproteínas virales de fusión (Skehel y Wiley, 2000; Earp et al., 2005; Marsh et al., 2006; Weissenhorn et al., 2007; Kielian, 2006; Sapir et al., 2008; Martens y McMahon, 2008). En general, las proteínas virales de fusión se encuentran en un estado “inactivo” (no funcional) en la superficie del virión. Después de un estímulo que puede ser el reconocimiento a un receptor celular, cambios de pH o cortes proteolíticos, estas proteínas se activan y sufren una serie de cambios conformacionales que conducen a la exposición de un péptido de fusión (Durell et al., 1997; Jahn et al., 2003), el cual se inserta en la membrana de la célula hospedera (Martens y McMahon, 2008).

Una vez que se inserta el péptido de fusión, ocurre una serie de cambios conformacionales en la proteína de fusión que permiten el acercamiento de la membrana celular y la envoltura viral (Weissenhorn et al., 2007; Harrison, 2008; Martens y McMahon, 2008). Los cambios conformacionales antes mencionados involucran la formación de intermediarios de fusión energéticamente estables y estructuralmente distintos para cada una de los tipos de proteínas virales de fusión que se conocen (Han et al., 2001; Gibbons et al., 2004; Stiansy et al., 2007; Roche et al., 2006). Por último, se mezclan los lípidos de ambas membranas en un proceso que está mediado tanto por el péptido de fusión como por las regiones transmembranales de las proteínas virales de fusión (Martens y McMahon, 2008). Basándose en la estructura secundaria de las glicoproteínas virales de fusión, se puede clasificar a estas proteínas en tres grandes grupos.

Las glicoproteínas virales de fusión Tipo 1

Las glicoproteínas virales de fusión del tipo I poseen una estructura secundaria compuesta en su mayoría por α -hélices. Una vez que reconocen a su receptor celular, estas glicoproteínas cambian de conformación formando un intermediario de fusión caracterizado por la presencia de una estructura especializada llamada “coiled-coil” que está formada por tres alfa hélices enrolladas entre si. Dentro de este grupo se encuentran la hemaglutinina del virus de la Influenza (Fig.4) (Skehel, 2000; Han, 2001) y la gp41 del virus de Inmunodeficiencia Humana (Melikyan, 2000)

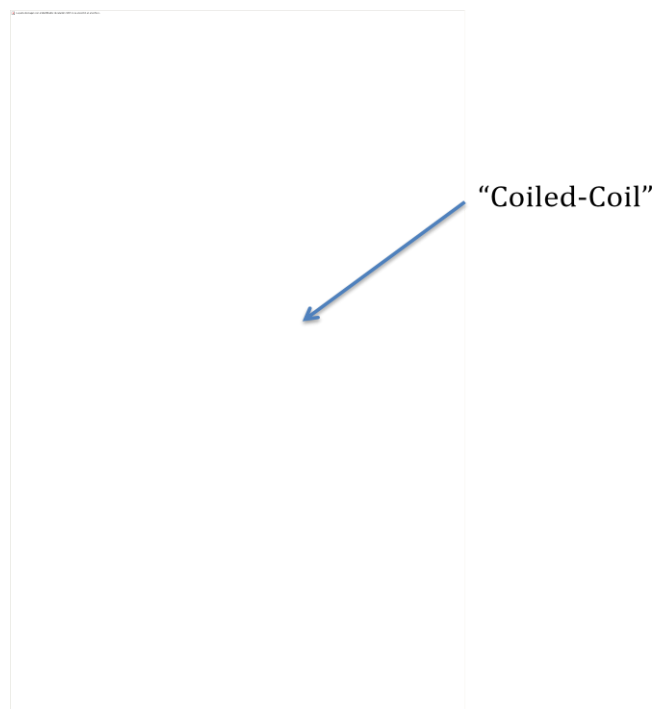


Figura 4: Estructura de la hemaglutinina del virus de Influenza. La imagen muestra la estructura tridimensional de la hemaglutinina del virus de influenza que representa la estructura clásica de tallo y asa de las glicoproteínas de fusión tipo 1. También se puede observar la región de “coiled-coil” (Martens y McMahon, 2008).

Las glicoproteínas virales de fusión tipo II

Las glicoproteínas virales de fusión tipo II se caracterizan por presentar un gran número de tiras β -plegadas dentro de su estructura secundaria. Estas proteínas

se encuentran, en su forma inactiva, asociadas en dímeros orientados paralelamente a la superficie de la envoltura viral, sin embargo, después de reconocer a su receptor celular, dichas proteínas cambian de conformación y se asocian en trímeros más estables (Wahlberg, 1992; Wahlberg, 2003) que adoptan una estructura de tallo y asa (Zhang, 2004; Stiansy, 2007). Dentro de las proteínas virales de fusión tipo II se encuentra la proteína de fusión del virus de Semliki Forest (Gibbons, 2004; Roussel, 2006) y la proteína E del virus del Dengue (Fig. 5) (Modis, 2004; Harrison, 2008).

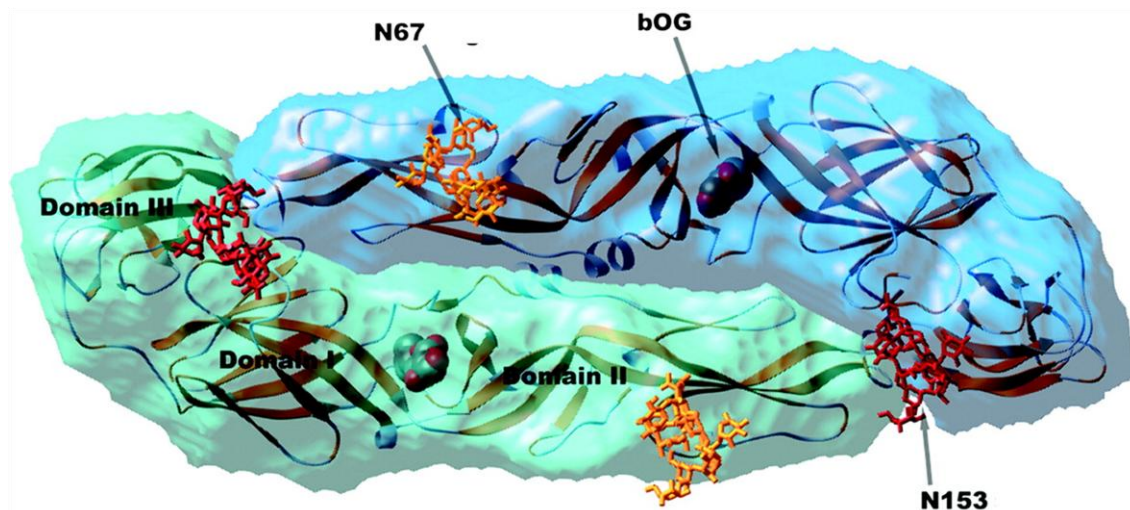


Figura 5: Estructura de la proteína E del virus del Dengue: las dos subunidades del dímero están coloreadas en sombras de azul. Los 3 dominios que conforman cada subunidad están indicados en la subunidad del lado izquierdo. En amarillo y rojo se marcan los residuos de azúcares unidos al Asn 67 y al Asn 153. bOG es una molécula de β -octil glucósido localizada en una hendidura entre los residuos II y III (Rey, 2003).

III.3. Las glicoproteínas virales de fusión tipo III

Las glicoproteínas virales de fusión tipo III se caracterizan por poseer una estructura secundaria en la que se encuentra el mismo número de α -hélices y de tiras β -plegadas. Los cambios conformacionales en estas proteínas no involucran rompimientos proteolíticos a diferencia de las glicoproteínas tipo I y

II, se ha reportado que los cambios conformacionales de las glicoproteínas virales de fusión tipo III son reversibles y los intermediarios de fusión que forman también adoptan una estructura de tallo y asa. Dentro de esta familia se encuentra la glicoproteína G del Virus de la Estomatitis Vesicular (Fig.6)(Roche, 2006).

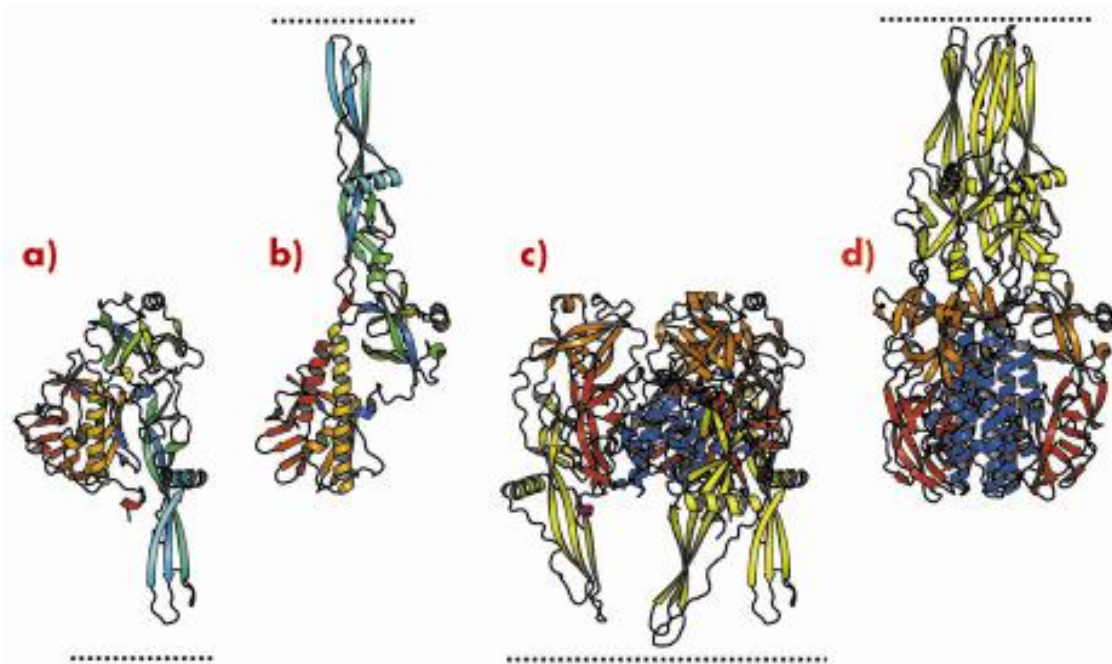


Figura 6: Estructura de la glicoproteína G del Virus de la Estomatitis Vesicular. a) Protómero inactivo de la glicoproteína G de VSV. b) Cambio conformacional ocasionado por el reconocimiento a receptor el un protómero de la glicoproteína G de VSV. c) Estructura trimérica en estado inactivo de la glicoproteína G de VSV. d) Cambio conformacional ocasionado por el reconocimiento a receptor en la estructura trimérica glicoproteína G de VSV.

(<http://www.esrf.eu/UsersAndScience/Publications/Highlights/2007/SB/SB3>) .

IV.Las glicoproteínas efectoras de la fusión en los Herpesvirus

La glicoproteína B

La glicoproteína B es una de las glicoproteínas efectoras de la fusión de los herpesvirus (Maurer 2008, Atanasiu 2007; Reske,2007). La estructura tridimensional de esta glicoproteína fue determinada en el año de 2006 (Fig.7)

(Heldwein, 2006). Esta glicoproteína está constituida por tres protómeros idénticos denominados A, B y C. Cada uno de los protómeros está unido a los otros dos por medio de interacciones electrostáticas y fuerzas hidrofóbicas. Cada uno de los protómeros posee 5 dominios definidos, siendo el dominio IV el más importante para la fusión de membranas ya que dentro de este dominio hay asas de fusión capaces de insertarse en la membrana de la célula hospedera (Hannah, 2007). A partir de estos estudios se pudo observar una gran similitud estructural entre gB y la glicoproteína G del Virus de la Estomatitis Vesicular (Roche, 2006) por lo que se considera que gB es una glicoproteína viral de fusión tipo III (Fig. 7).

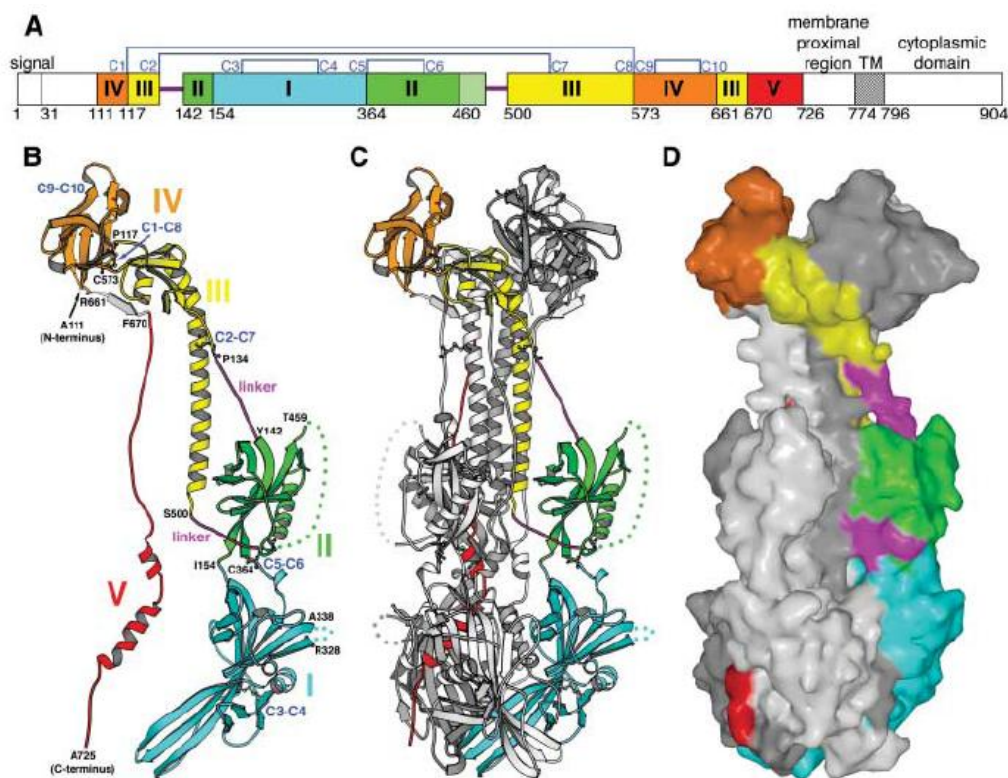


Figura 7. Estructura de la glicoproteína B de HSV-1 A) Representación lineal de los dominios de la glicoproteína B de HSV-1, cada dominio se muestra en diferente color B) Monómero de la glicoproteína B de HSV-1 en representación de listones, el dominio IV es el más alejado de la envoltura viral., C) trímero de la gB de HSV-1 en representación de listones, D) superficie expuesta de un trímero de gB (Heldwein et al.,2006).

Estudios más recientes llevados a cabo por Backovic et al., en 2009 con la glicoproteína B del virus de Epstein Barr (EBV) demostraron que esta glicoproteína posee dos conformaciones energéticamente estables lo cual es congruente con los cambios conformacionales observados en otras glicoproteínas virales de fusión tipo III (Backovic, 2009; Roche, 2006).

El heterodímero gH-gL

El heterodímero formado por las glicoproteínas gH y gL es el otro efector de la fusión de membranas y es indispensable para completar este proceso (Maurer 2008). Este heterodímero se mantiene unido por interacciones no covalentes entre la región amino terminal gH y la amino terminal de gL (Peng et al., 1998; Hutchinson et al., 1992). La gH de HSV-1 posee ocho cisteínas enlazadas que no forman puentes disulfuro con ninguna de las cuatro cisteínas presentes en gL. La glicoproteína H posee diversas características que asemejan a las proteínas virales de fusión tipo I. La gH de HSV-1 posee dos α -hélices hidrofóbicas(α -H1 y α -H2) que podrían actuar como péptidos de fusión (Colman y Lawrence, 2003). Al sustituir la α H-1 en la gH de HSV-1 con péptidos de fusión provenientes de otras proteínas virales no se afecta la infectividad del virus, lo que claramente muestra que esta hélice tiene propiedades similares a las de otros péptidos de fusión (Gianni et al., 2005; Gianni et al., 2006).

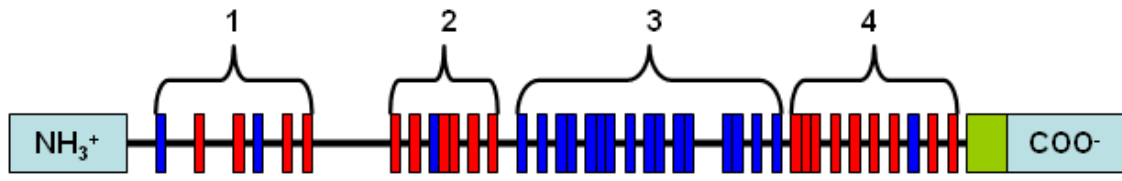
Además de poseer un posible péptido de fusión, la gH de HSV-1 presenta regiones hepta repetidas las cuales podrían estar involucradas en la formación

de los “coiled-coils” como sucede en otras glicoproteínas virales de fusión tipo I. (Gianni et al., 2005; Gianni et al., 2006). Estudios bioinformáticos previos llevados a cabo en nuestro laboratorio con la glicoproteína H de distintos herpesvirus, mostraron la alta similitud estructural que existe entre la gH de todos los miembros de la familia *Herpesviridae*, lo que claramente habla de la similitud que hay en el proceso de fusión de membranas dentro de esta familia de virus (Fig. 8) (Torres, 2007; Jones y Geraghty, 2004).

V. El proceso de fusión de membranas

Como ya se mencionó el proceso de fusión inicia con el reconocimiento de gD a su receptor celular lo cual provoca una serie de cambios conformacionales en gD que le permiten interactuar con la glicoproteína H (Krummenacher et al., 2005; Conolly et al., 2002, 2003; Carfi et al., 2001; Spear et al., 2006; Zhou et al., 2007) que a su vez, cambia de conformación pasando a un estado “activo” para la fusión (Maurer 2008; Avitable 2007). Una vez que se activa gH, una porción entre los residuos 300 y 400 de su intermediario de fusión queda expuesta y activa a la glicoproteína B (Maurer et al., 2008; Heldwein et al., 2006). La activación de gB estabiliza los complejos de fusión permitiendo así, que el proceso de fusión de membranas se complete, liberando las cápsides desnudas al citoplasma celular (Fig. 9) (Maurer et al., 2008; Atanasiu et al., 2007).

HSV-1

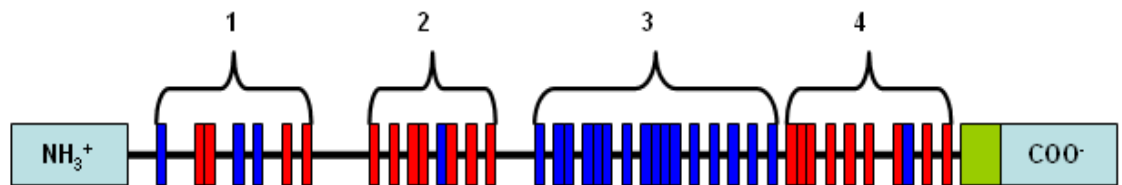


Estructura Secundaria



Regiones Hidropáticas

VZV

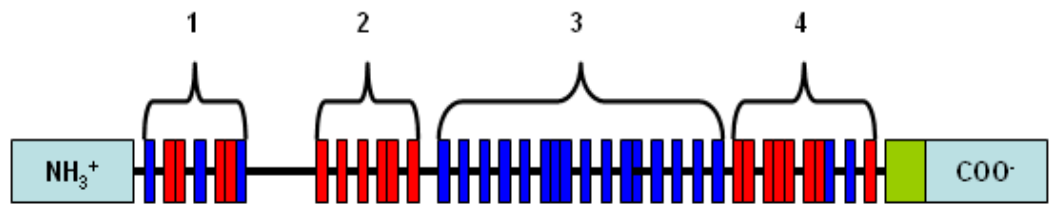


Estructura Secundaria



Regiones Hidropáticas

HCMV

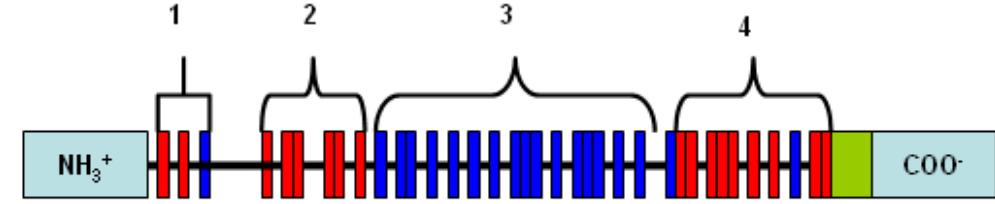


Estructura Secundaria



Regiones Hidropáticas

EBV



Estructura Secundaria



Regiones Hidropáticas

Figura 8. Esquema general de la estructura secundaria y las propiedades hidropáticas de la gH de distintos herpesvirus. En la barra superior se encuentra un representación gráfica de la estructura secundaria; en azul están marcadas las regiones que adoptan estructura de α -hélice; en rojo están marcadas las regiones que adoptan estructura de β -plegados; en verde claro se marca la hélice transmembranal., En la barra inferior están marcadas las regiones hidropáticas de gH; en verde oscuro las regiones hidrofílicas, ;en color turquesa las regiones hidrofóbicas y en amarillo las regiones capaces de insertarse en membrana (Torres, 2007).

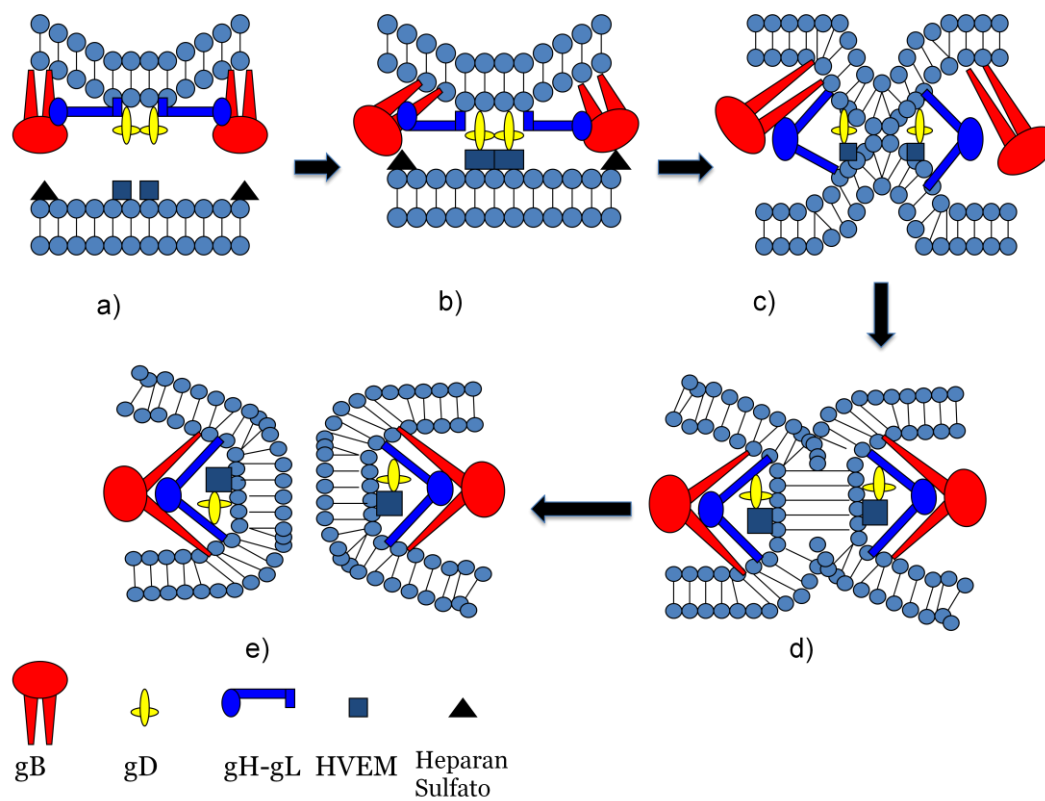


Fig.9. Representación esquemática de la fusión de los herpesvirus. a) El virus se acerca a la membrana de la célula hospedera. b) Se inicia el proceso de fusión por la interacción de gD con su receptor celular, también ocurren interacciones de gB con moléculas de heparán sulfato que estabilizan la unión. c) Después de la unión a receptor, gD cambia de conformación lo que permite su interacción con gH/gL. Esto induce un cambio conformacional en gH/gL lo que permite que una porción de este complejo se inserte en la membrana de la célula hospedera permitiendo una mezcla inicial de lípidos entre la envoltura viral y la membrana celular. d) gB cambia de conformación por interacciones con el complejo formado por gH/gL y gD lo que permite la unión de gB a la membrana plasmática y la fusión completa. e) El poro de fusión se estabiliza y las cápsidas desnudas entran al citoplasma celular. (Modificado de: Maurer et al., 2008)

VI. Los herpesvirus y los síndromes que producen

Los Herpesvirus que tienen como único huésped natural al humano son responsables de distintos síndromes, a la fecha, se conocen nueve de estos capaces de infectar humanos (Tabla 1).

Tabla 1. Herpesvirus humanos y los distintos síndromes que provocan.

Tipo	Nombre	Subfamilia	Síndrome
HHV-1	Herpes Simplex tipo 1	α	Herpes oral o genital (oral principalmente)
HHV-2	Herpes Simplex tipo 2	α	Herpes oral o genital (genital principalmente)
HHV-3	Virus de la Varicela Zoster	α	Varicela y Zoster
HHV-4	Virus de Epstein Barr	γ	Mononucleosis Infecciosa Y Linfoma de Burkitt
HHV-5	Citomegalovirus Humano	β	Síndrome Citomegálico
HHV-6A	Género Roseolovirus	β	Exantema subitum
HHV-6B			
HHV-7		β	Pitiriasis Rosea
HHV-8	Herpes virus asociado a sarcoma de Kaposi	γ	Sarcoma de Kaposi.

La subfamilia *Alphaherpesvirinae* y su patogénesis

La subfamilia *Alphaherpesvirinae* incluye tres virus capaces de infectar humanos, los Herpes Simplex Virus tipo 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2) y el virus de la varicela zóster.

Los HSV son virus neurotrópicos y pueden ocasionar una amplia variedad de síndromes clínicos, que van desde una infección asintomática hasta cuadros de encefalitis, que aunque raros, tienen una elevada mortalidad y producen secuelas neurológicas graves en los pacientes que logran sobrevivir (Roizman y Pellet, 2007).

La infección herpética inicia con la entrada del virus a través de una lesión en la mucosa del tracto genital u oral de una persona susceptible (seronegativa) después de entrar en contacto con secreciones de una persona infectada (seropositiva). El virus se replica en el tejido epitelial por el cual penetró provocando una infección primaria y a partir de ahí, se disemina al tejido nervioso ascendiendo por transporte axonal retrógrado a través de los nervios sensoriales periféricos hasta llegar a un ganglio sensorial en el cual establece un estado de latencia. Una vez en estado de latencia, estímulos apropiados como el estrés y la inmunosupresión entre otros, causan una reactivación del virus ocasionando que los virus viajen por transporte axonal anterógrado hasta el sitio de la infección original (Roizman y Pellet, 2007; Beauman, 2005).

Las reactivaciones de HSV-1 y HSV-2 son frecuentes durante la vida del individuo y pueden ser de tipo asintomático o clínico (provocando la aparición de vesículas o úlceras).

El virus del Herpes Simplex tipo 1 (HSV-1) es el principal agente etiológico del herpes orofacial., Este virus establece latencia comúnmente en el nervio trigémino, por otro lado, el virus del Herpes Simplex tipo 2 (HSV-2) es uno de

los agentes transmitidos por vía sexual más comunes en la actualidad y tiene una preferencia por el nervio sacro para establecer estados de latencia. Datos epidemiológicos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) indican que aproximadamente el 46% (\approx 150 millones de personas) de la población adulta de los Estados Unidos de Norteamérica está infectada con HSV-1 y que existen entre 40 y 60 millones de personas infectadas con HSV-2. En países en vías de desarrollo como México, la OMS señala que la incidencia de las infecciones genitales por HSV-2 es del 40% en la Ciudad de México (WHO, 2008). Las reactivaciones de HSV-1 y HSV-2 pueden alcanzar una tasa de incidencia de hasta un 30% en la población adulta según datos de la OMS, sin embargo, esta tasa es todavía mayor en pacientes infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV). Aunado a lo anterior, se ha observado un incremento significativo de lesiones genitales asociadas a HSV-1 y de lesiones orofaciales asociadas a HSV-2, todo ello relacionado con la actividad sexual orogenital (Weiss, 2004; Herrera et al., 2005).

Aproximadamente un 25% de las personas infectadas con HSV-1 excretan el virus en la saliva mientras que un 55% de las personas con infecciones genitales asintomáticas por HSV-2 excretan virus en secreciones genitales (Corey y Wald, 1999). Las infecciones herpéticas genitales tanto primarias como por reactivación, representan un riesgo severo de encefalitis durante el embarazo, ya que el neonato puede infectarse al pasar por el canal de parto, lo que representa un grave problema de salud pública en la actualidad (Kimberlin, 2004). Las reactivaciones de HSV-1 y HSV-2 en pacientes con infecciones por HIV también se han asociado con un aumento en la replicación del HIV, lo que

generalmente desencadenan el cuadro de SIDA en estos pacientes (Golden et al., 1992; Mole et al., 1997).

ANTECEDENTES

I. Antivirales

Existen diferentes compuestos antivirales empleados contra las infecciones herpéticas, las cuales se tratan comúnmente con análogos nucleosídicos como el Aciclovir, penciclovir y desoxiguanosina. Estos compuestos son análogos de bases que se fosforilan específicamente en las células infectadas por una timidina cinasa viral (TK). Por medio de fosforilaciones posteriores llevadas a cabo por distintas enzimas celulares se obtiene Aciclovir o Penciclovir trifosfato los cuales compiten con el GTP celular resultando en una inhibición de la DNA polimerasa viral (Elion, 1993; Vere Hodge, 1993; O'Brien, 1989).

Estos antivirales son altamente específicos dado que actúan únicamente sobre células infectadas. Pero con el paso del tiempo, han surgido diferentes cepas de HSV resistentes ellos sobre todo en pacientes inmunosuprimidos como aquellos que están infectados con HIV (Englund, et al., 1990; Christophers et al., 1998; Gaudreau et al., 1998), aunque también hay reportes de cepas de HSV-2 resistentes al Aciclovir en individuos inmunocompetentes (Kost et al., 1993).

Estos virus mutantes presentan distintas alteraciones en la timidina cinasa viral (TK) de manera que la actividad de esta enzima cambia, impidiendo la fosforilación del Aciclovir y el Penciclovir. También existen mutantes en los que la DNA polimerasa está alterada y aunque no son muy frecuentes, estos mutantes también son resistentes al Aciclovir (Coen, 1980; Sacks, 1989).

Recientemente, otro medicamento en contra de las infecciones herpéticas fue aprobado por la FDA bajo el nombre comercial de Abreva (GlaxoSmithKline). Este medicamento es un derivado del docosanol (n-docosanol) el cual puede inhibir la entrada de distintos virus envueltos (incluidos los herpesvirus) a su célula hospedera (**Pope, 1998**).

II. Los péptidos antivirales

Los péptidos sintéticos dirigidos contra distintos virus son una de las terapias antivirales más novedosas en la actualidad. Se reconocen varias clases de péptidos antivirales entre las que se encuentran aquellos que atraviesan la membrana celular inhibiendo procesos biosintéticos del virus dentro de las células, aquellos que son inhibidores de proteasas virales y por último aquellos que bloquean la fusión de membranas entre el virus y su célula hospedera.

Péptidos que atraviesan la membrana celular

Se encontró que péptidos derivados de diferentes péptidos señal como el del Factor de Crecimiento de Fibroblastos 4(FGF4) o de péptidos señal capaces de atravesar membranas poseen actividad antiviral contra HSV-1. Estos péptidos poseen distintas propiedades, ya que no todos actúan a la misma temperatura ni bajo las mismas condiciones de pH. Sin embargo, estos péptidos no son capaces de inactivar los viriones de HSV-1 y su actividad se presenta después de la entrada del virus a la célula (Bultmann, 2001; Bultmann, 2002).

Péptidos inhibidores de proteasas

Este tipo de péptidos ha sido muy poco estudiado debido a la dificultad de inhibir a las proteasas virales de manera específica, sin afectar otro tipo de proteasas celulares, sin embargo, existen péptidos sintéticos contra picornavirus que son específicos contra la proteasa viral y no tienen actividad sobre otras proteasas celulares como las caspasas involucradas en procesos apoptóticos (Deszcz, 2006).

Péptidos inhibidores de la fusión.

Los primeros acercamientos hacia este tipo de terapia antiviral corresponden a algunos estudios hechos con el HTLV tipo 1 (Human T-cell Lymphotropic Virus). Con la finalidad de estudiar las propiedades de las proteínas de fusión de este virus se diseñaron diversos péptidos sintéticos entre los que se encontraron algunos capaces de inhibir la formación de sincitios debida a la infección por HTLV (Sagara, 1996). Estudios posteriores demostraron que péptidos derivados de ciertas regiones de las glicoproteínas virales gp46 y gp21 eran capaces de bloquear la infección en una etapa posterior a la adsorción del HTLV a las células (Jinno, 1999).

También se logró demostrar que la inhibición de la entrada de HTLV-1 a sus células hospederas era independiente a una proteína llamada Hsc70 que es el receptor celular de dicho virus. Por lo tanto, se demostró que los péptidos sintéticos son capaces de reconocer a la proteína de fusión y que dicho reconocimiento impide que se de la infección (Brighty, 2001).

Para el año 2003, Piñón y colaboradores demostraron que ciertos péptidos sintéticos derivados de la región carboxilo terminal del ectodominio de la

proteína transmembranal (TM) del HTLV-1 eran potentes inhibidores de la infección por este virus. Además comprobaron la importancia de la estructura de dichos péptidos, ya que éstos eran capaces de reconocer una región hepta-repetida en esta proteína que es capaz de formar estructuras de “coiled-coils” y aquellos péptidos que no reconocían esta región, fueron incapaces de bloquear la infección (Piñón, 2003).

Los péptidos sintéticos con propiedades antivirales no sólo actúan sobre la entrada de los virus a las células. Existen péptidos sintéticos contra picornavirus que son específicos contra la proteasa viral y no tienen actividad sobre otras proteasas celulares como las caspasas involucradas en procesos apoptóticos (Deszcz, 2006).

El virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) ha sido difícil de tratar debido al surgimiento de genotipos de HIV resistentes a las distintas terapias antivirales aplicadas en la actualidad. Existen diferentes estudios realizados con este virus en los cuales se bloquea la glicoproteína de fusión (gp41) mediante el empleo de péptidos sintéticos derivados de la misma. Dichos péptidos reconocen una región importante en esta glicoproteína y por lo tanto son capaces de bloquear la infección por HIV *in vitro* (Elgerlhofer, 2004). Existe un antiviral, aprobado por la FDA, llamado Enfuvirtide, el cual es un inhibidor de la fusión de HIV y que es un péptido sintético capaz de reconocer la glicoproteína de fusión de este virus. El Enfuvirtide es producido por distintas farmacéuticas entre las que está Roche que lo produce bajo el nombre comercial de Fuzeon (Roche, 2005).

Así como en el caso de el Enfuvirtide, se ha intentado diseñar péptidos sintéticos dirigidos específicamente contra diferentes proteínas virales de fusión. Existen péptidos diseñados contra el virus del oeste del nilo (WNV), el virus de la influenza, el virus de la hepatitis C y contra el virus del SARS entre otros. Todos estos péptidos están específicamente dirigidos contra las proteínas de fusión de estos virus y son derivados de dichas glicoproteínas o se encontraron por diferentes métodos como el despliegue en fagos entre otros (VanCompernelle, 2003; Ho, 2006; Bai, 2007; Jones,2006).

Por todo lo antes mencionado, en este proyecto nos propusimos el diseño de péptidos sintéticos derivados de la glicoproteína H con los cuales sea posible bloquear la infección de HSV-1 y HSV-2 a su células hospederas. La glicoproteína H se eligió como blanco en este estudio ya que es activada en un inicio por el intermediario de fusión que forma gD al reconocer a su receptor celular por lo que péptidos derivados de la porción carboxilo terminal de gH podrían bloquear esta activación al unirse al intermediario fusogénico de gD. Además, gH tiene una región capaz de interactuar con gB, por lo que también es posible bloquear la activación de esta proteína con péptidos sintéticos derivados de gH.

JUSTIFICACIÓN

Debido a la elevada incidencia de las infecciones herpéticas a nivel mundial, a las complicaciones asociadas a este tipo de infecciones, al reducido número de antivirales disponibles para tratarlas y al surgimiento de cepas de herpesvirus resistentes a los antivirales que se emplean en la actualidad, es necesario el desarrollo de nuevas terapias antivirales que sean específicas, eficaces y que presenten nuevos blancos para tratar las infecciones herpéticas, por lo que en este trabajo, se planteó el diseño de un péptido derivado de la glicoproteína viral gH para bloquear la infección por HSV-1 y HSV-2 *in vitro*.

HIPÓTESIS

Ya que la glicoproteína H de los herpesvirus es una de las glicoproteínas virales esenciales para completar el proceso de fusión de membranas entre el virus y su célula hospedera y gracias al grado de conservación estructural que existe entre la gH de HSV-1 y HSV-2, es posible diseñar péptidos sintéticos derivados de la glicoproteína H de HSV-1 que puedan impedir las interacciones entre las proteínas involucradas en la fusión de membranas y por lo tanto, puedan bloquear la infección por HSV-1 y HSV-2 *in vitro*.

OBJETIVO GENERAL

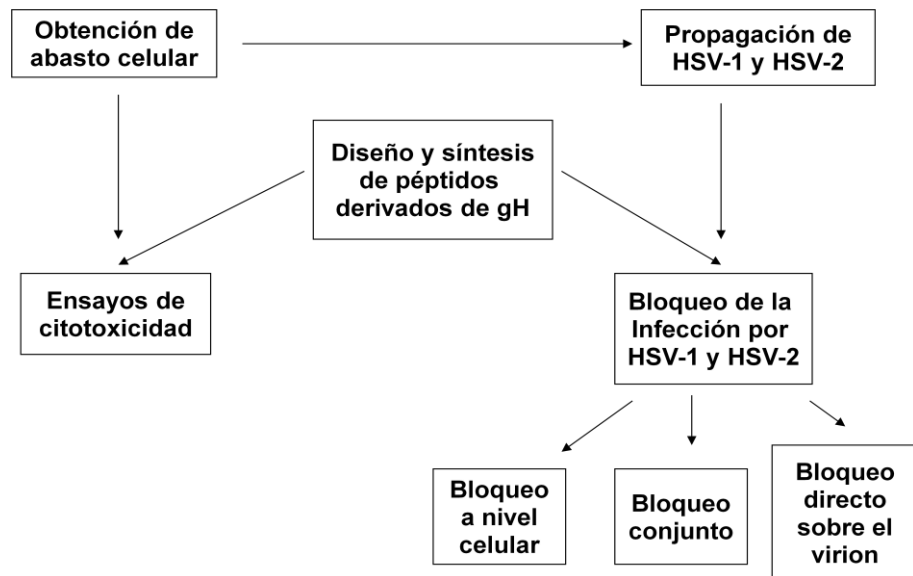
- Diseñar diferentes péptidos sintéticos derivados de la glicoproteína H de HSV-1 y evaluar su capacidad para bloquear la infección por HSV-1 y HSV-2 *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

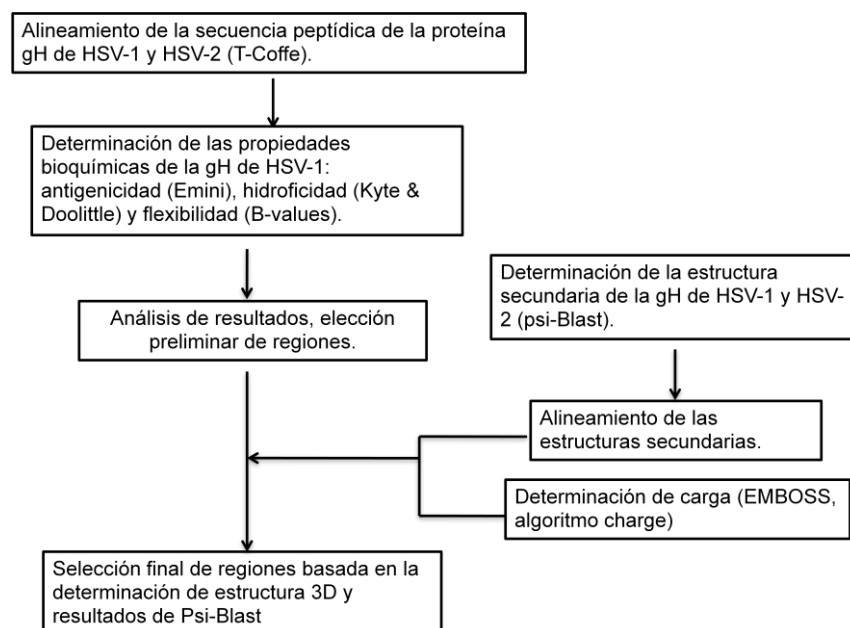
- Analizar distintas propiedades bioquímicas y estructurales de la glicoproteína H de HSV-1 con ayuda de herramientas bioinformáticas para diseñar un panel de péptidos sintéticos derivados de esta glicoproteína.
- Determinar la citotoxicidad de los péptidos sintéticos diseñados.
- Evaluar la capacidad de los péptidos sintéticos para bloquear la infección por HSV-1 y HSV-2 *in vitro*.
- Determinar la concentración óptima de péptido necesaria para bloquear la infección herpética *in vitro*.
- Comparar la efectividad antiherpética de los péptidos sintéticos diseñados con la del Aciclovir.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

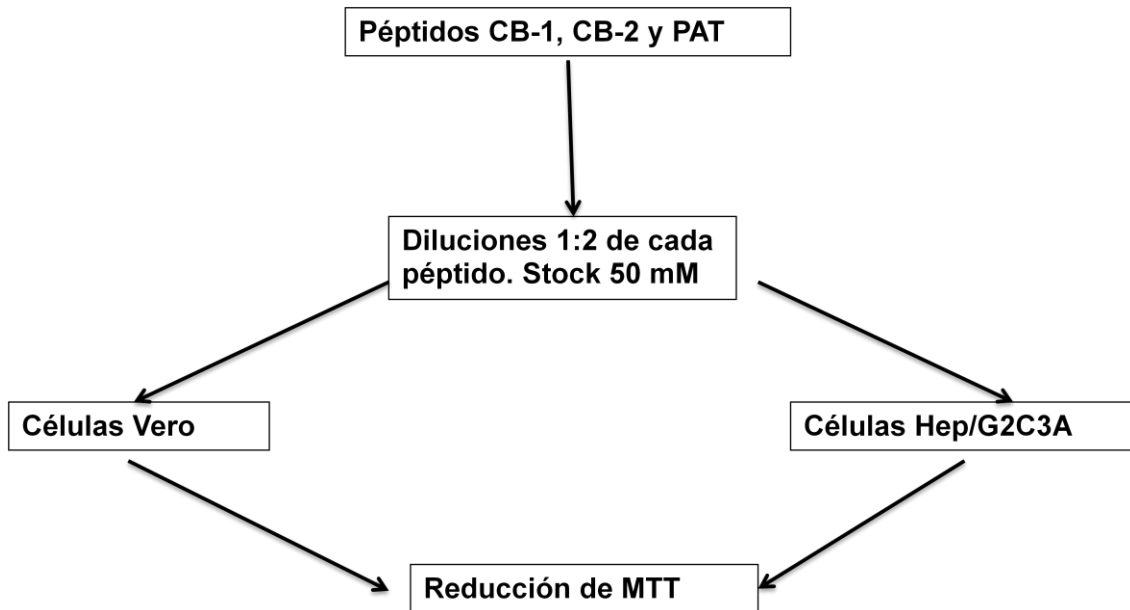
I. Esquema general



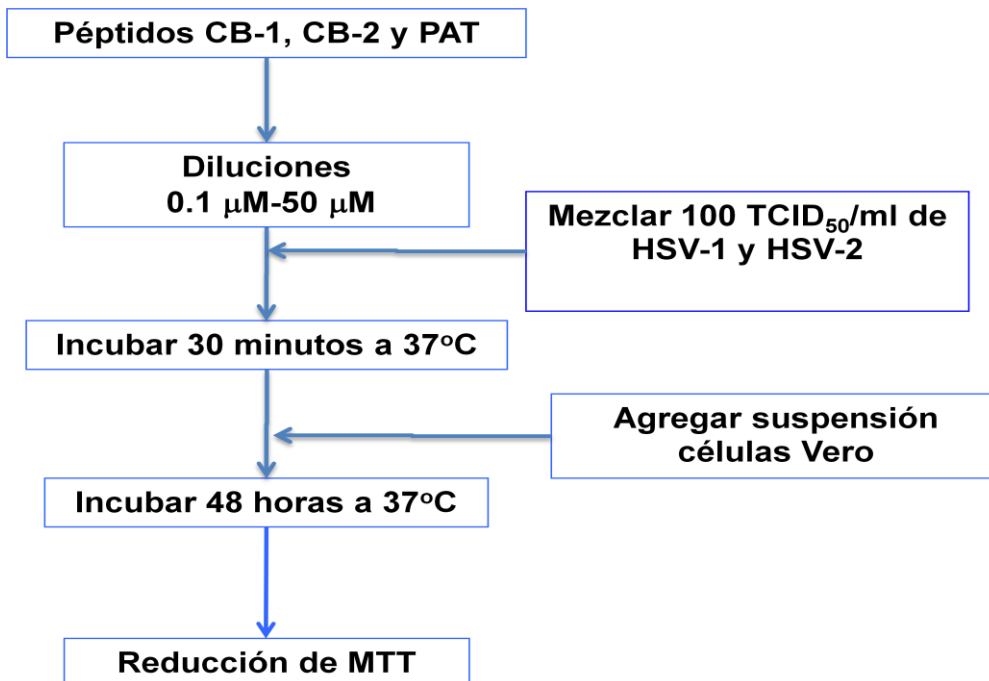
II. Diseño de los péptidos



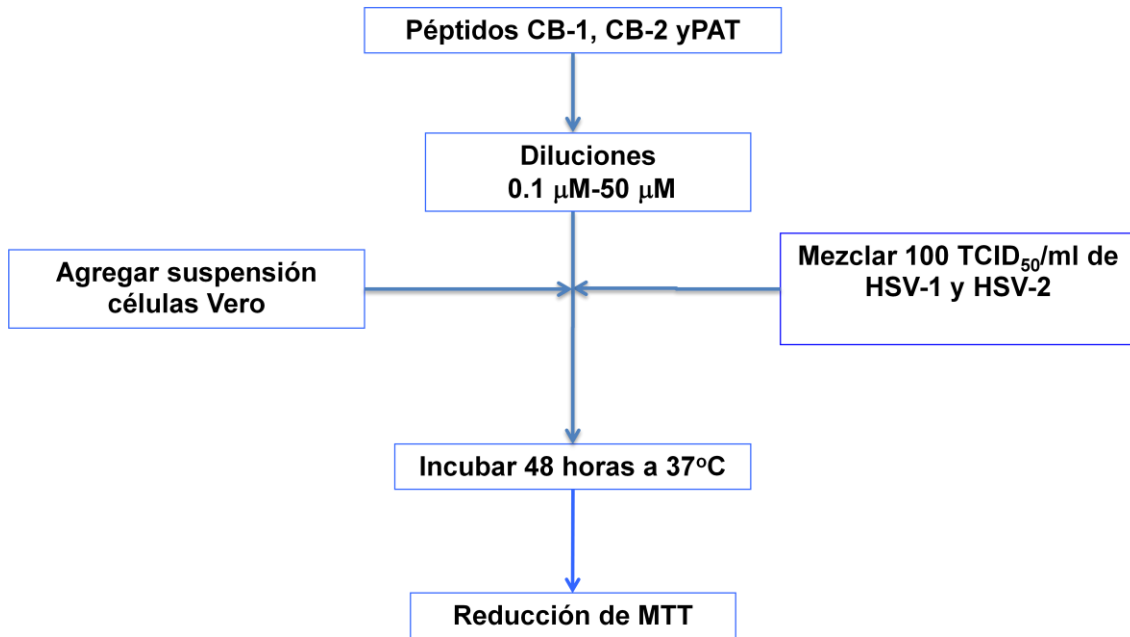
III. Ensayos de Toxicidad



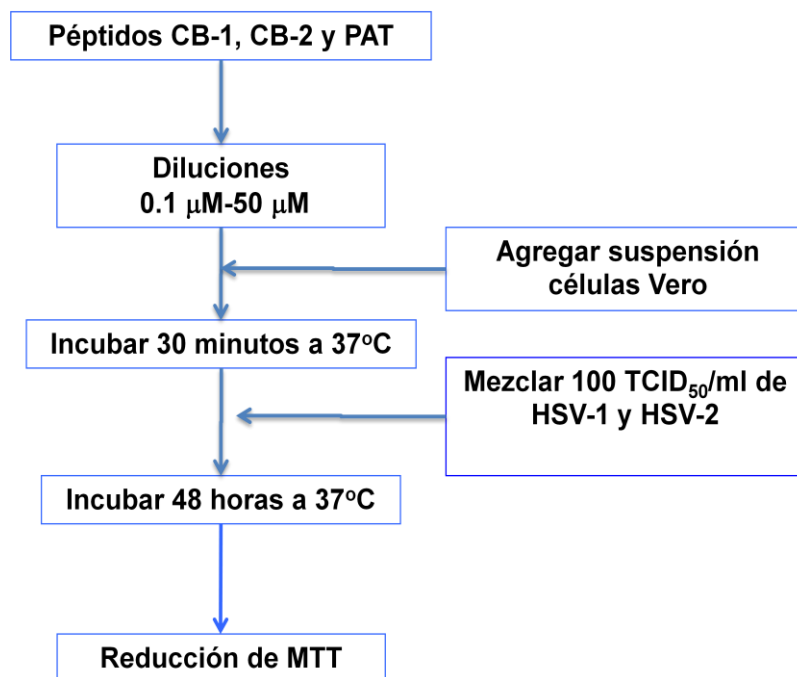
IV. Ensayos de Bloqueo sobre el virión



V. Ensayos de bloqueo conjunto



VI. Ensayos de bloqueo sobre las células



METODOLOGÍA

I. Propagación de células y virus

I.I. Descongelación de células Vero

Se descongela un vial de células Vero y se coloca en una botella de cultivo celular que contenga medio de crecimiento M199 (adicionado de 0.17% de NaHCO_3 , 6% de suero de neonato y 0.025% de L-glutamina). Las células se incuban a 37°C en atmósfera de 5% de CO_2 durante toda la noche. Al día siguiente se retira el medio de cultivo con pipeta, se cambia por medio fresco de crecimiento M199. Las células se incuban nuevamente a 37°C en atmósfera de CO_2 hasta que alcanzan una confluencia total (Barrón,1998).

I.II. Subcultivo de Células Vero

Se elimina el medio de crecimiento de una botella con células al 100% de confluencia, por la cara opuesta a la monocapa celular y se agregan 1.5 ml de una solución de tripsina al 0.025% en verseno al 0.05% (Tripsina-verseno). Con esta solución se lava la monocapa celular y por el lado opuesto de la botella se elimina. Se vuelve a añadir un volumen de 1.5 ml de la solución tripsina-verseno y se baña la capa celular. Se remueve el exceso de solución dejando únicamente 0.5 ml de la solución de tripsina-verseno y se deja actuar la solución residual el tiempo necesario para que las células se disgreguen (aproximadamente 5 minutos a 37°C). Se golpea la botella para desprender la capa celular, se adicionan 3 ml de medio de crecimiento y se homogeneiza la suspensión por pipeteo suave.

Se coloca un volumen de la suspensión obtenida anteriormente en una botella de cultivo celular y se agregan aproximadamente 9 volúmenes de medio de crecimiento M199. Se tapan las botellas y se incuban a 37°C hasta que alcanzan la confluencia. (Barrón,1998).

I.III. Propagación de HSV-1 y HSV-2 en células Vero

Se inocula una botella confluyente de células Vero utilizando una multiplicidad de infección (MOI) de 0.01. Las células infectadas se incuban a 37°C hasta que las células presenten de un 80 a 90% de efecto citopático. En ese punto se lleva a cabo la cosecha de virus mediante un proceso de congelación-descongelación. Se eliminan los residuos celulares por centrifugación y se envasa el sobrenadante en viales con volúmenes de 0.2-0.5 ml. Las cepas virales empleadas fueron para HSV-1 la cepa MacIntyre y para HSV-2 la cepa G (Barrón,1998).

I.IV. Titulación viral

Se utilizó el micrométodo de dosis infectivas al 50%, para lo cual se siembra una microplaca de 96 pozos con una suspensión celular ajustada a 125,000 células/ml, colocando 100 µl de esta suspensión en cada pozo de la placa. Se preparan diluciones decimales del virus cosechado que van desde 10⁻¹ hasta 10⁻⁸ con un volumen final de 2 ml. Se toman 100 µl de cada dilución y se depositan en cada uno de los pozos de la microplaca usando ocho pozos por dilución. Se incluye un testigo de células no infectadas y un testigo de células infectadas con el virus sin diluir. Se incuba la microplaca a 37°C en atmósfera de CO₂ y se observa diariamente al microscopio anotando el

número total de pozos que presentan efecto citopático (ECP). El título se calcula por el método de Reed-Muench (Barrón,1998).

II. Diseño y síntesis de péptidos.

II.I. Obtención de secuencias de la glicoproteína H.

Las secuencias de la glicoproteína H para cada uno de los virus estudiados se obtuvieron del banco de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nih.gov>). Los números de acceso se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Números de acceso de las secuencias de nucleótidos del genoma de HSV-1 y HSV-2 y de las secuencias de aminoácidos de la gH de cada uno de estos virus.

Virus	No. acceso del genoma	No. acceso de la glicoproteína H
HSV-1	NC_001806	NP_044623.1
HSV-2	NC_001798	NP_044491.1

II.II. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de gH con T-Coffee

Las secuencias de aminoácidos de los precursores de la gH de HSV-1 y HSV-2 se alinearon mediante el programa T-Coffee (Notredame et al, 2000), disponible en <http://www.ebi.ac.uk/t-coffee/> , para comparar el grado de similitud que existe entre ambas glicoproteínas. Los alineamientos se guardaron en formato FASTA para su análisis posterior.

II.III. Obtención de los perfiles de hidrofobicidad de gH

Para obtener los perfiles de hidrofobicidad de la gH de HSV-1 se utilizó ProtScale (Gasteiger, 2005) disponible en <http://ca.expasy.org/tools/protscale.html>. En este estudio la escala que se empleó fue la de Kyte-Doolittle y se utilizó una amplitud de ventana de 7 (Kyte y Doolittle, 1982) con el fin de determinar cuáles eran las regiones más expuestas de la gH de HSV-1 con base en la hidrofobicidad de sus residuos.

II.IV. Determinación de las propiedades antigénicas de gH.

Para determinar el perfil antigénico de la gH de HSV-1 se utilizó el programa Antibody Epitope Prediction empleando la escala de antigenicidad propuesta por Parker (Parker et. al., 1986) disponible en http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input. El análisis previo se llevó a cabo para determinar las regiones más expuestas de la gH de HSV-1 con base en una escala basada en estudios de accesibilidad de anticuerpos.

II.V. Determinación de la flexibilidad de cadena.

Para determinar la flexibilidad de cadena de aminoácidos de la gH de HSV-1 se utilizó el programa PROFbval (Schlessinger, 2005; *Schlessinger*, 2006). El método está disponible en <http://cubic.bioc.columbia.edu/services/profbval/>.

II.VI. Predicción de estructura secundaria con PSIPRED

Para determinar la estructura secundaria de la gH de HSV-1 se utilizó el programa PSIPRED (Jones ,1999). Este programa está calificado en el CASP 7 (Critical Assesment of Techinques for Protein Structure Prediction 7) como uno de los mejores para la predicción de estructura secundaria. El programa PSIPRED se descargó del sitio <http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/> y se utilizó a través del servidor remoto del laboratorio de Biotecnología y Bioinformática Genómica de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas con licencia a nombre del Dr. Alfonso Méndez Tenorio.

II.VII. Alineamiento de estructuras secundarias

Para hacer un alineamiento de las estructuras secundarias de la gH de HSV-1 y HSV-2 se utilizó el programa Praline (Simossis, 1999; Simossis, 2005; Cuff, 2000; Lin, 2005), el cual calcula los alineamientos basándose en estructuras secundarias obtenidas con PSIPRED para cada una de las proteínas problema. Dicho programa está disponible en <http://zeus.cs.vu.nl/programs/pralinewww/>.

II.VIII. Determinación de carga de la gH

Para determinar la carga de la gH se utilizó el programa Charge, disponible en el servidor de EMBOSS (Rice, 2000), al cual se accedió a través de la página del curso de bioinformática del Programa de posgrado en Biomedicina y Biotecnología Molecular de la ENCB <http://148.204.168.187/bioinformatica/>

II.IX. Determinación de la estructura 3D de los péptidos

La posible estructura terciaria de los péptidos seleccionados se predijo con el algoritmo Rosetta (Rohl, 2002) disponible en el servidor HMMSTR/Rosetta (Bystroff, 2002) el cual puede encontrarse en <http://www.bioinfo.rpi.edu/bystrc/hmmstr/server.php>.

II.X. Síntesis de los péptidos

Se mandaron sintetizar tres péptidos de 18 residuos cada uno (llamados CB-1, CB-2 y PAT) por síntesis en fase sólida (Invitrogen). La pureza fue mayor al 70% y la composición de cada uno de los péptidos se comprobó mediante cromatografía de alta presión en fase líquida. Los tres péptidos sintetizados eran altamente hidrofílicos por lo que fueron disueltos en agua a una concentración final de 5mM. Para su almacenaje se dividieron en alícuotas de 100 μ l y se almacenaron a -10°C .

III. Ensayos de citotoxicidad

III.I. Propagación de células HepG2/C3A

Se descongela un vial de Células HepG2/C3A [ATCC:CRL-10741] y se coloca en una botella de cultivo celular que contenga medio de crecimiento MEM (Modified Eagle's Essential Medium) (adicionado de 2mM de aminoácidos esenciales, 1mM de piruvato de sodio, 1500 mg/L de bicarbonato de sodio y 10% de suero fetal de bovino). Las células se incuban a 37°C en atmósfera de CO_2 durante toda la noche. Al día siguiente

se retira el medio de cultivo con pipeta, se cambia por medio fresco de crecimiento MEM. Las células se incuban nuevamente a 37°C en atmósfera de CO₂ hasta que alcanzan una confluencia total.,

III.II. Ensayos de citotoxicidad

La citotoxicidad de cada uno de los 3 péptidos (CB-1, CB-2 y PAT) se determina tanto en la línea celular HepG2/C3A [ATCC:CRL-10741] como en la línea celular Vero, para esto, se diluyen los péptidos por separado en medio de mantenimiento (adicionado de 3% de suero) para obtener una solución con una concentración final de péptido de 200 µg/ml. Por otro lado se llena una microplaca de 96 pozos con una concentración de 100 µl de medio de mantenimiento en cada pozo (Excepto en la hilera 11 que se deja vacía) y se colocan 100 µl de la dilución de péptido con 100µM en cada uno de los pozos de la primera hilera de la microplaca para alcanzar una concentración final de péptido de 50µM. Se resuspende bien esta mezcla con ayuda de una micropipeta multicanal., Se toman 100 µl de la mezcla anterior y se transfieren a la siguiente hilera de la microplaca resuspendiendo bien la mezcla con ayuda de la micropipeta multicanal., El procedimiento anterior se repite entre cada hilera hasta llegar a la hilera 10 de la microplaca. Se desechan 100 µl de la última hilera para que cada hilera quede llena con 100 µl de la solución de péptido diluido a las siguientes concentraciones (50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.5625, 0.78125, 0.390625, 0.19 y 0.05 µM). La hilera 11 se deja vacía y la hilera 12 se usa como testigo celular. Se siembra la microplaca con una suspensión celular ajustada a 125,000 células por mililitro colocando 100 µl de esta suspensión

en cada pozo de la placa (Excepto en la hilera 11). Se incuba la microplaca a 37°C en atmósfera de CO₂ durante 48 horas y se procede a medir la citotoxicidad causada por los péptidos mediante un ensayo de reducción de MTT.

III.III. Ensayo de reducción de MTT

Este ensayo se basa en la reducción metabólica del bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo) 2,5 difeniltetrazol (MTT) realizado por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán). Para el ensayo de reducción de MTT se colocan 50 µl de una solución de MTT a una concentración de 1 mg/ml en PBS en cada uno de los pozos de la microplaca sembrada en el ensayo anterior (dos microplacas para cada péptido, una en la que se prueba su citotoxicidad en células Vero y otra en HepG2/C3A). Las microplacas se incuban a 37°C de 4-6 horas y pasado este tiempo se agrega a cada pozo 50 µl de una solución de SDS al 10% en ácido clorhídrico 0.01N. Las microplacas se incuban nuevamente a 37°C durante toda la noche y se leen en un espectrofotómetro para ELISA a 540 nm. Para calcular la toxicidad de los péptidos se utiliza la siguiente fórmula

$$\% \text{Toxicidad} = [\text{As CP} / \text{As TC}] * 100$$

Donde:

As CP= Absorbancia de las células tratadas con péptido

As TC= Absorbancia del testigo celular.

IV. Ensayos de actividad antiviral de los péptidos

IV.I. Sobre el virus

Este ensayo consiste en colocar directamente los péptidos con el virus para determinar la infectividad residual., Con esto se busca determinar la capacidad de los péptidos de unirse a algún componente del virus para bloquear la infección. Para esto se hacen diluciones seriadas de los péptidos en una microplaca de 96 pozos de la misma manera en la que se hicieron para los ensayos de toxicidad. En la hilera 12 se dejan 6 pozos como testigo de células y 2 pozos como testigo de virus. Se colocan 100 μ l de una suspensión viral que contenga 100 TCID₅₀/ ml en los primeros 6 pozos de las hileras 1-11 y en los 2 últimos pozos de la hilera 12, se colocan 100 μ l de medio de mantenimiento en los otros 2 pozos de cada hilera para usar como testigo de toxicidad. Las microplacas se incuban a 37°C durante 30 minutos y una vez transcurrido este tiempo se siembran con una suspensión celular ajustada a 125,000 células por mililitro colocando 100 μ l de esta suspensión en cada pozo de la placa. Se incuban las microplacas a 37°C hasta que los testigos virales presenten el 100% de efecto citopático. En ese momento se realiza el ensayo de reducción de MTT de la misma manera en la que se realizó para la determinación de citotoxicidad de los péptidos. La fórmula utilizada para calcular el porcentaje de protección de los péptidos es la siguiente:

$$\% \text{Protección} = [\text{AsCP} - ((\text{AsTC} - \text{AsTT}) / (\text{AsTV}))] * 100$$

Donde:

As CP= Absorbancia de las células tratadas con péptido

As TV= Absorbancia del testigo viral

As TC= Absorbancia del testigo celular.

As TT= Absorbancia del testigo de toxicidad

IV.II. Sobre la infección simultanea

En este ensayo se demuestra el efecto que tienen los péptidos al incubarlos en conjunto con el virus y las células, esto para determinar si los péptidos actúan al momento del contacto virus-célula, para ésto se hacen diluciones seriadas de los péptidos en una microplaca de 96 pozos de la misma manera en la que se hicieron para los ensayos de toxicidad. En la hilera 12 se dejan 6 pozos como testigo de células y 2 pozos como testigo de virus. Se siembran las microplacas con una suspensión celular ajustada a 125,000 células por mililitro colocando 100 μ l de esta suspensión en cada pozo de la placa, inmediatamente después se colocan 100 μ l de una suspensión viral que contenga 100 TCID₅₀/ ml en los primeros 6 pozos de las hileras 1-11 y en los 2 últimos pozos de la hilera 12, se colocan 100 μ l de medio de mantenimiento en los otros 2 pozos de cada hilera para emplearlos como testigo de toxicidad. Se incuban las microplacas a 37°C hasta que los testigos virales presenten el 100% de ECP. En ese momento se realiza el ensayo de reducción de MTT de la misma manera en la que se realizó para determinar la citotoxicidad de los péptidos. La fórmula utilizada para calcular el porcentaje de protección de los péptidos es la siguiente:

$$\% \text{Protección} = [\text{AsCP} - (\text{AsTC} - \text{AsTT}) / \text{AsTV}] * 100$$

Donde:

As CP= Absorbancia de las células tratadas con péptido

As TV= Absorbancia del testigo viral

As TC= Absorbancia del testigo celular.

As TT= Absorbancia del testigo de toxicidad

IV.III. Tratamiento sobre las células

Este ensayo se utiliza para observar si los péptidos interactúan con las células y gracias a esto bloquean la infección. Se siembran las microplacas con una suspensión celular ajustada a 125,000 células por mililitro colocando 100 μl de esta suspensión en cada pozo de la placa. Las microplacas se incuban a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% durante 24 horas ó hasta que todos los pozos alcancen confluencia. Una vez transcurrido este tiempo se hacen diluciones seriadas de los péptidos en la microplaca previamente sembrada de la misma manera en la que se hicieron para los ensayos de toxicidad. En la hilera 12 se dejan 6 pozos como testigo de células y 2 pozos como testigo de virus.. Se incuban las microplacas a 37°C durante 30 minutos. Se lavan las microplacas con PBS 1X o con medio de mantenimiento para eliminar todo el péptido que no se hubiera adherido a las células y posteriormente se colocan 100 μl de una suspensión viral que contenga 50 TCID₅₀/ ml en los primeros 6 pozos de las hileras 1-11 y en los 2 últimos pozos de la hilera 12, se colocan 100 μl de

medio de mantenimiento en los otros 2 pozos de cada hilera para emplearlos como testigo de toxicidad. Se incuban las microplacas a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% hasta que los testigos virales presenten el 100% de ECP. En ese momento se realiza el ensayo de reducción de MTT de la misma manera en la que se realizó para determinar la citotoxicidad de los péptidos. La fórmula utilizada para calcular el porcentaje de protección de los péptidos es la siguiente:

$$\% \text{Protección} = [\text{AsCP} - ((\text{AsTC} - \text{AsTT}) / \text{AsTV})] * 100$$

Donde:

As CP= Absorbancia de las células tratadas con péptido

As TV= Absorbancia del testigo viral

As TC= Absorbancia del testigo celular.

As TT= Absorbancia del testigo de toxicidad

RESULTADOS

I. Diseño, selección y Síntesis de péptidos

I.I. Obtención de los perfiles de hidrofobicidad y flexibilidad de la gH de HSV-1

Con las secuencias de aminoácidos de la gH de HSV-1 se construyeron diferentes perfiles bioquímicos.

La hidrofobicidad de gH se determinó para buscar aquellas regiones potencialmente expuestas hacia la superficie de la proteína. Para esto se empleó la escala de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle (Kyte y Doolittle, 1982) Los resultados se obtuvieron tanto en formato gráfico como numérico sin embargo, se descargaron los resultados numéricos para su análisis posterior.

La antigenicidad de la gH se determinó con la escala propuesta por Parker (Parker et al., 1986) la cual permite la predicción de regiones antigénicas debido a que dicha escala fue construida con datos de interacciones entre anticuerpos y proteínas. Las regiones antigénicas generalmente están expuestas por lo que debido a este hecho se decidió utilizar dicha escala. Esta determinación se llevó a cabo con ayuda del programa Antybody Epitope Prediction y los resultados numéricos se descargaron para su análisis posterior.

La flexibilidad de la cadena principal de aminoácidos de gH se determinó con el programa PROFbval (Schlessinger, 2005). Con ayuda de éste programa se

determinaron aquellas regiones de gH que son mucho más flexibles lo que favorecería sus interacciones con otras proteínas. Los resultados numéricos también se descargaron para su análisis.

Para facilitar la interpretación de los resultados, únicamente se muestran los resultados para la determinación de hidrofobicidad, antigenicidad y flexibilidad de la gH de HSV-1 (por residuo) de forma gráfica, los resultados numéricos no se incluyen, sin embargo, se analizaron individualmente antes de construir las gráficas. Los resultados se muestran en la figura 10.

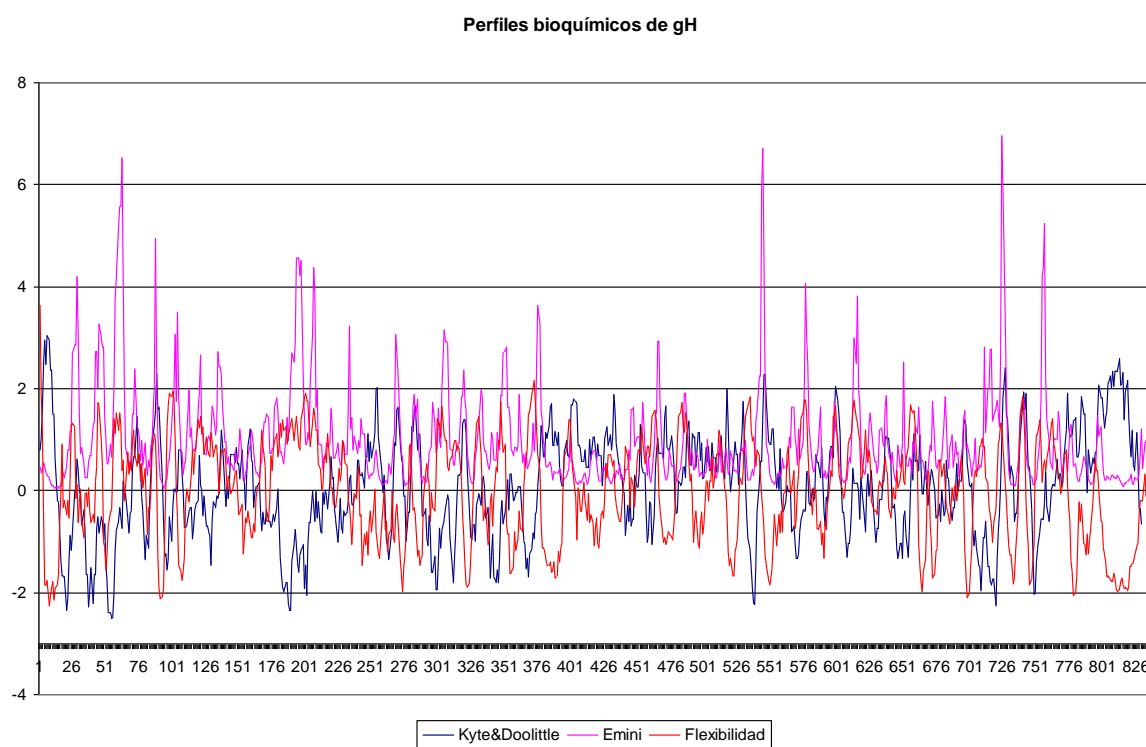


Figura 10. Gráfica de los perfiles bioquímicos residuo por residuo de la gH de HSV-1. En esta gráfica se muestran los valores por residuo de las determinaciones de hidrofobicidad, antigenicidad y flexibilidad para la gH de HSV-1. En color rosa se muestra la determinación de hidrofobicidad realizada con la escala de Kyte&Doolittle, en azul la determinación de antigenicidad realizada con la escala propuesta por Parker et. al., y en rojo la determinación de flexibilidad realizada con PROFbval.,

Para determinar si las propiedades bioquímicas determinadas para la gH de HSV-1 por cada residuo (hidrofobicidad, antigenicidad y flexibilidad de cadena) eran parecidas a las de regiones de 15 residuos se tomaron los valores numéricos individuales de cada 15 residuos y se obtuvo un valor promedio de los mismos. Estos valores promedio se graficaron de la misma manera que los valores individuales con la diferencia de que en la representación grafica mostrada en la figura 11, cada punto representa 15 residuos en vez de uno.

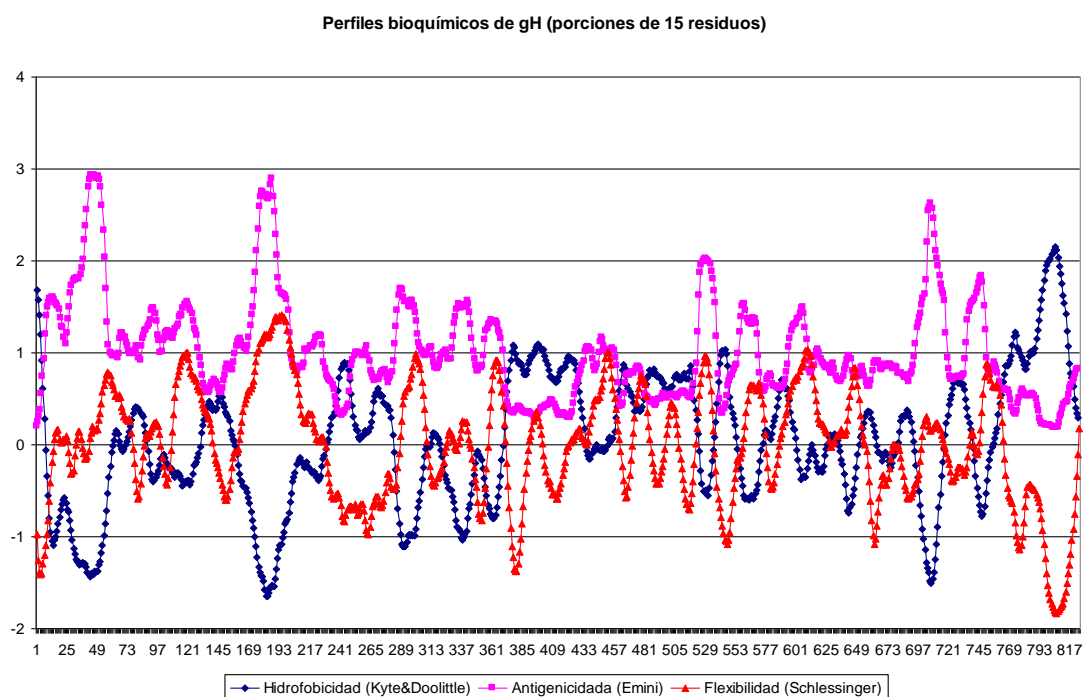


Figura 11. Gráfica de los perfiles bioquímicos de la gH de HSV-1 por porciones de 15 residuos. En esta gráfica se muestran los valores promediados por porciones de 15 residuos de las determinaciones de hidrofobicidad, antigenicidad y flexibilidad para la gH de HSV-1. En color rosa se muestra la determinación de hidrofobicidad realizada con la escala de Kyte&Doolittle, en azul la determinación de antigenicidad realizada con la escala propuesta por Parker et. Al., Y en rojo la determinación de flexibilidad realizada con PROFbval.,

La figura 11 muestra que hay regiones de 15 residuos en la gH de HSV-1 que están altamente expuestas (por ser hidrofílicas y antigénicas) además de ser

flexibles. Estas regiones se seleccionaron para llevar a cabo los análisis posteriores.

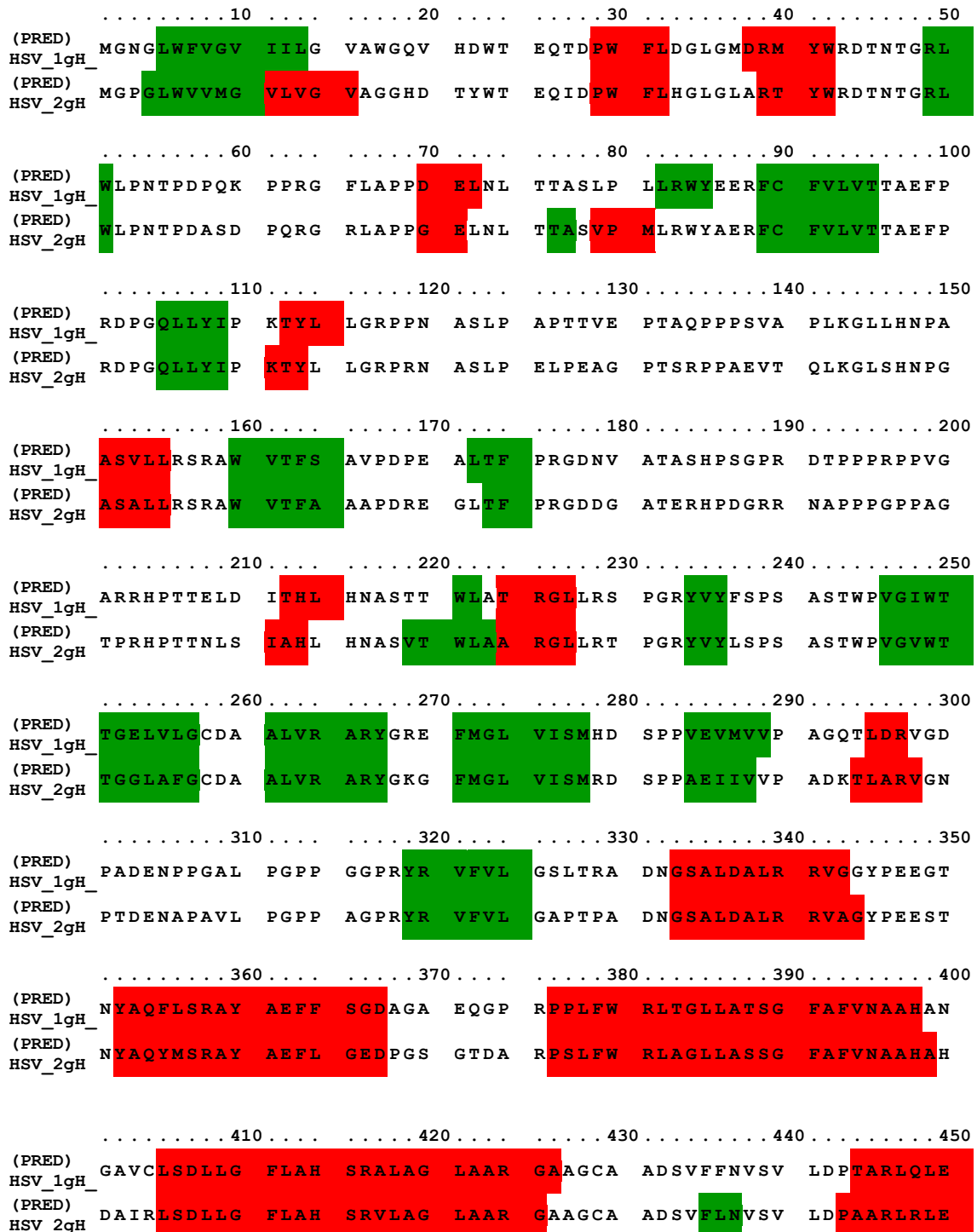
I.II. Determinación de la estructura secundaria de gH con PSIPRED

La estructura secundaria de la gH de HSV-1 se determinó con PSIPRED. Con este análisis se buscó predecir la estructura secundaria que posee dicha glicoproteína para poder correlacionar los datos de los perfiles bioquímicos y los datos estructurales al momento de seleccionar aquellas regiones de esta glicoproteína de la que se derivarían los péptidos. Los resultados se muestran a continuación.

a) HSV-1

```
Conf: 986022156888733100000310116840032425521465426863265268888667
Pred: CCCC HHHHHHHHHHHHHHHHH CCCCCCCCCC EEEEEEE CCCC EEE CCCCCCCC
AA: MGNGLWFVGVIIILGVAWGQVHDWTEQTDPFWDGLGMDRMYWRDPATGRLWLPNTPDPQK
Conf: 887613772232111113412220003145999851007898620578730431589876
Pred: CCCCCC C HHH CCCCCC C HHHHHH C C EEEEEEE CCCCCCCCC EEEEE C HHH CCCCC
AA: PPRGFLAPPDELNLTTASLPLLRWYEERFCFVLTVAEFPRDPGQLLYIPKTYLLGRPPN
Conf: 78988888999788983477630015520147613563378981478533444222325
Pred: CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC C HHHHH C C C EEEEEEE CCCCCCCCC C C E E
AA: ASLPAPTTVEPTAQPPPSVAPLKGLLHNPAASVLLRSRAWVTFSAVPDPEALTFPRGDNV
Conf: 402688756789987785678887886245101058716899624433775158997766
Pred: E CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC C H C C C C C EEEEE C H H C C C EEEEE C C C
AA: ATASHPSGPRDTPPPRPPVGARRHPTTELDITHLHNASTTWLATRGLLRSPGRYVYFSPS
Conf: 677001221522356527257653555412112245513788468999624241002568
Pred: C C C C EEEEEEEEEEE C H H H H H H H H C H H H H EEEEE C C C C EEEEE C C C C C C C C C
AA: ASTWPVGIWTTGELVLGCDAALVRARYGREFMGLVISMHDSPPVEVMVVPAGQTLDRVGD
Conf: 566288878999999862599996333565531689999877548788768899998999
Pred: H H H C C C C C C C C C C C EEEEE C C C C C C C H H H H H H H H H C C C C C C C H H H H H H H
AA: PADENPPGALPGPPGPRYRVFVLGSLTRADNGSALDALRRVGGYPEEGTNYAQFLSRAY
Conf: 999987502014887278999999999999999876662101038989876744499999
Pred: H H H H H H H C C C C C C H H H H H H H H H H H H H H H H H H C C H H H H H H H H H H H H H H H
AA: AEFPSGDAGAEQGRPPLFWRLTGLLATSGFAFVNAAHANGAVCLSDLLGFLAHSRALAG
Conf: 986632688887111475560830001430121377787651102477666113233310
Pred: H H H H H C C C C C C C C C H H H C C C C C C C H H H H H H H H H H H H H H H H H H C
AA: LAARGAAGCAADSVFFNVSVLDPTARLQLEARLQHLVAEILEREQSLALHALGYQLAFVL
Conf: 5666643467778999999999987355124872689999999998726445676502333
Pred: C C C C C H H H H H H H H H H H H H H H C C C C C C C H H H H H H H H H H H H H H H
AA: DSPSAYDAVAPSAHLIDALYAEFLGGRVLTTPVVHRALFYASAVLRQPFLAGVPSAVQR
Conf: 204789998763158889987687899887213378875100010223345421123330
Pred: H H H H H H H H H H H C C C H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H H
AA: ERARRSLLIASALCTSDVAAATNADLRALTALRADHQKTLFWLPDHFSPCAASLRFDLDES
```


lo que se puede confiar en que la determinación de estructura secundaria para ambos programas es igual., Con la diferencia de que en Praline no se muestra la confiabilidad de la predicción. El alineamiento se muestra en la figura 13.



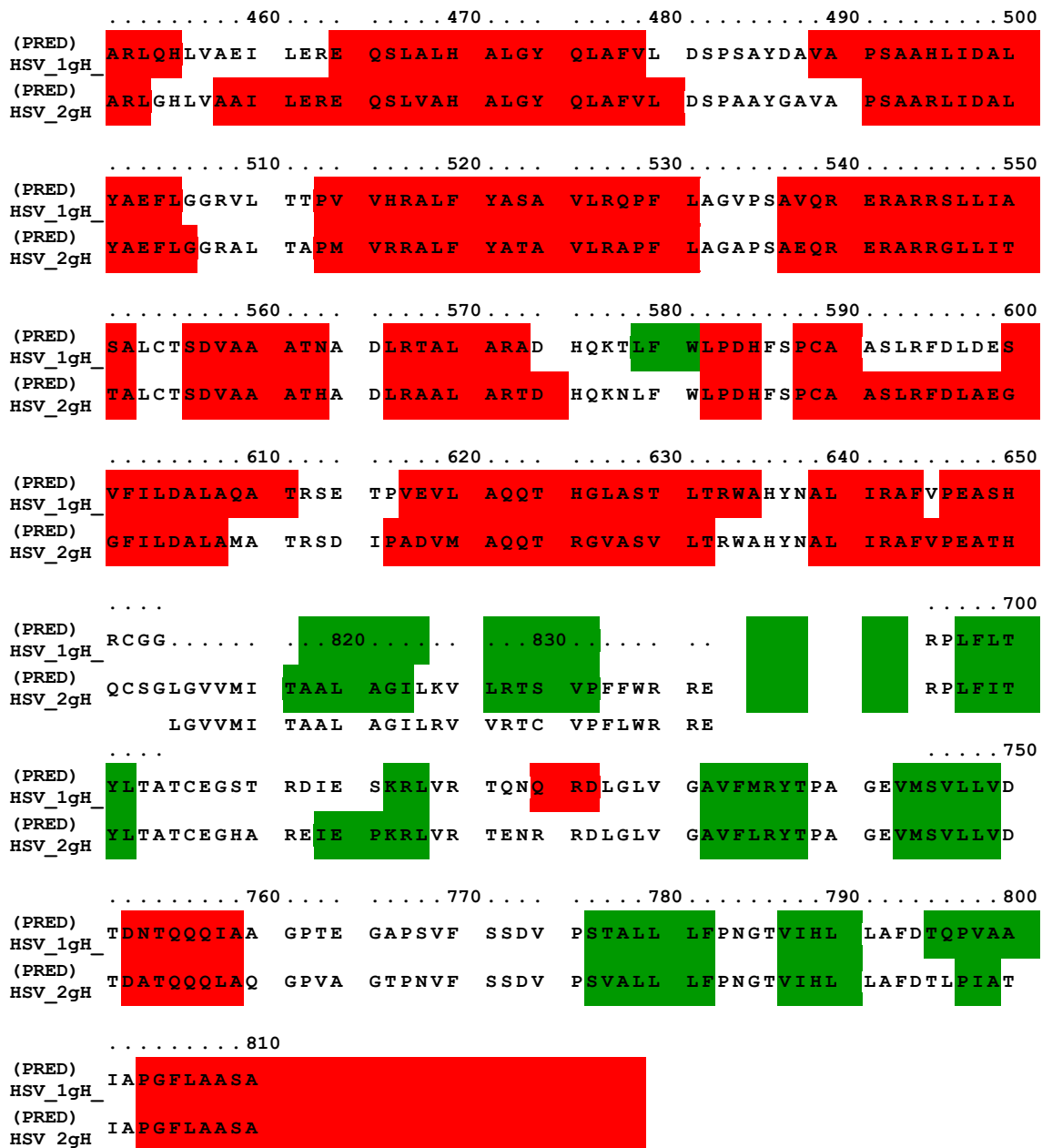


Figura 13. Alineamiento de la estructura secundaria de la gH de HSV-1 y HSV-2 con Praline. En rojo se muestran las regiones correspondientes a α -hélices, en verde las regiones correspondientes a tiras β -plegadas y sin color se muestran las regiones que corresponden a estructuras de lazo.

Los resultados del alineamiento muestran que la gH de ambos virus (HSV-1 y HSV-2) tiene una estructura secundaria muy similar. Existen regiones en la gH de HSV-1 que no poseen estructura secundaria definida lo que no concuerda con la predicción del programa PSIPRED (Fig. 12). Sin embargo, en análisis

posteriores, se utilizó la predicciónn obtenida con PSIPRED para asignar estructura secundaria a estas regiones no definidas .

I.IV. Determinación de la carga de gH con el programa Charge

La determinación de carga de la glicoproteína H de HSV-1 se realizó con el programa Charge, disponible en el servidor de Emboss. Los resultados gráficos se muestran en la figura 14.

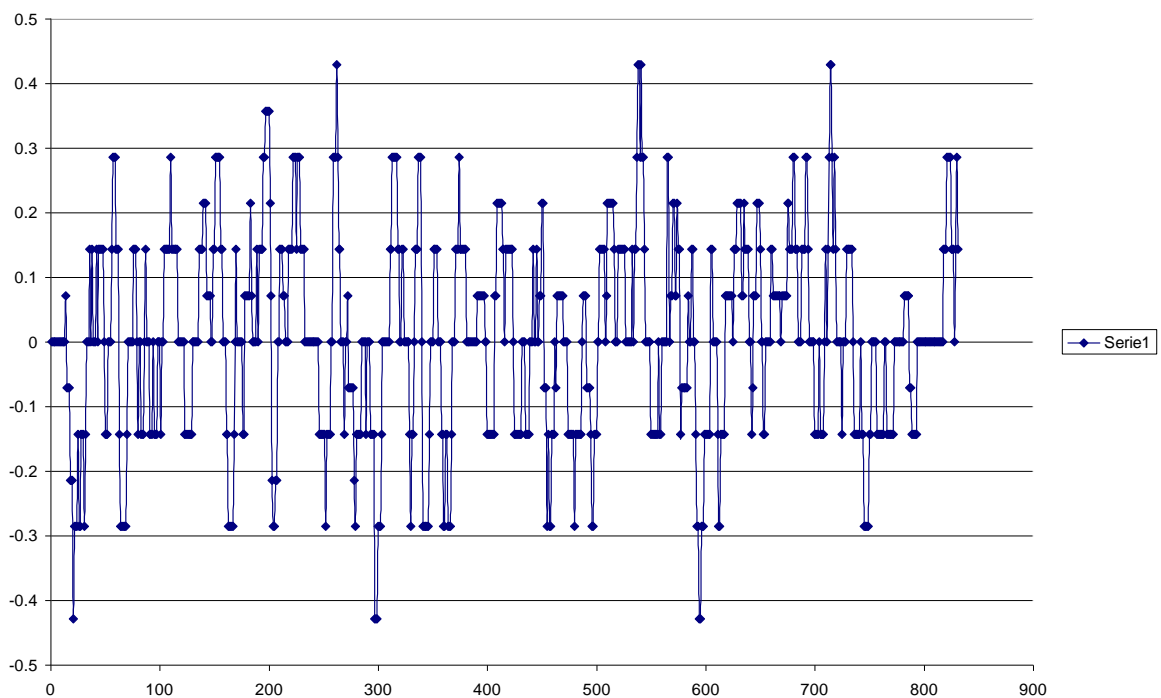


Figura 14. Gráfica de la Determinación de la carga de gH de HSV-1 con el programa Charge. En esta gráfica se puede observar la determinación de carga (porciones de 15 residuos) de la glicoproteína H de HSV-1.

Las gráficas de carga representan la carga de porciones de 15 residuos, de la misma manera en la que se representaron anteriormente los perfiles de hidrofobicidad. En está gráfica se puede observar que la gH de HSV-1 posee

regiones que tienen tanto carga positiva como negativa. Dichas regiones pueden interactuar electrostáticamente ya sea con otras proteínas o para darle estructura a gH. todos los datos anteriores se conjuntaron para hacer la selección de los péptidos que se emplearon en este estudio.

I.V. Selección de péptidos

Para la selección de los péptidos que pudieran bloquear la infección por HSV-1 y HSV-2, derivados a partir de la gH de HSV-1 se llevaron a cabo dos etapas de selección.

En la primera etapa de selección, las secuencias de aminoácidos de la gH de HSV-1 y HSV-2 se alinearon con el programa T-COFFEE con la finalidad de observar el grado de similitud que existe entre ambas proteínas y determinar si existía la posibilidad de que péptidos derivados de la gH HSV-1, fueran capaces de bloquear la infección de ambos virus. Con los datos obtenidos con T-COFFEE, el grado de similitud que se encontró fue de 87% lo cuál es un indicativo de la alta semejanza que existe en la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas, por lo que se optó por diseñar los péptidos a partir de la gH de HSV-1.

Para hacer el diseño de los péptidos se tomaron en cuenta las propiedades bioquímicas de la gH y se llevó a cabo un análisis de su hidrofobicidad, antigenicidad y de la flexibilidad de la cadena polipeptídica principal de dicha glicoproteína (no se toma en cuenta la flexibilidad de los grupos R de cada

residuo). Se buscaron aquellas regiones que fueran altamente hidrofílicas, que estuvieran expuestas según los datos de antigenicidad y que fueran flexibles.







Del proceso de selección primaria se escogieron 11 péptidos que poseían las características bioquímicas antes mencionadas (flexibilidad, hidrofílicidad y antigenicidad). Para refinar la selección aun más, se realizó un proceso de selección secundario, el cual consistió en determinar la estructura secundaria de la gH de HSV-1 con el programa PSIPRED (Jones, 1999). Una vez determinada dicha estructura se procedió a hacer un alineamiento de las estructuras secundarias de la gH de HSV-1 y HSV-2 con el programa Praline el cual permite comparar la estructura secundaria entre dos o más proteínas. Con esto se escogieron aquellas regiones en las que la estructura secundaria de ambas proteínas estuviera conservada. Una vez obtenido el alineamiento se comparó la estructura secundaria obtenida para HSV-1 por Praline con la obtenida anteriormente con PSIPRED. Ya que ambas estructuras son determinadas con el mismo programa, lo que se pretendía con esto era corroborar que el alineamiento no interfiere con la determinación de estructura secundaria. Por otro lado, también se necesitaban los valores de confiabilidad de la predicción obtenidos con PSIPRED para escoger aquellas regiones en las que la predicción tuviera altos valores de confiabilidad ya que estos datos no se muestran en el alineamiento obtenido con Praline.




Se determinó la carga de la gH de HSV-1 ya que las regiones que se van a utilizar deben poseer una carga neta ya sea positiva o negativa, debido al

hecho de que las interacciones entre proteínas virales y sus receptores son principalmente de tipo electrostático.

Conjuntando todos los datos anteriores se encontraron 6 regiones que podrían ser posibles blancos para el diseño de péptidos sintéticos. Dichas regiones se muestran en la tabla 3.

Tabla 3. Péptidos sintéticos seleccionados. En esta tabla se muestran los péptidos sintéticos seleccionados después de llevar a cabo dos etapas de selección. Se muestra la estructura secundaria de dichos péptidos además de la posición y la secuencia de los mismos. La carga aparece marcada con + o - dependiendo si dicha carga es positiva o negativa.

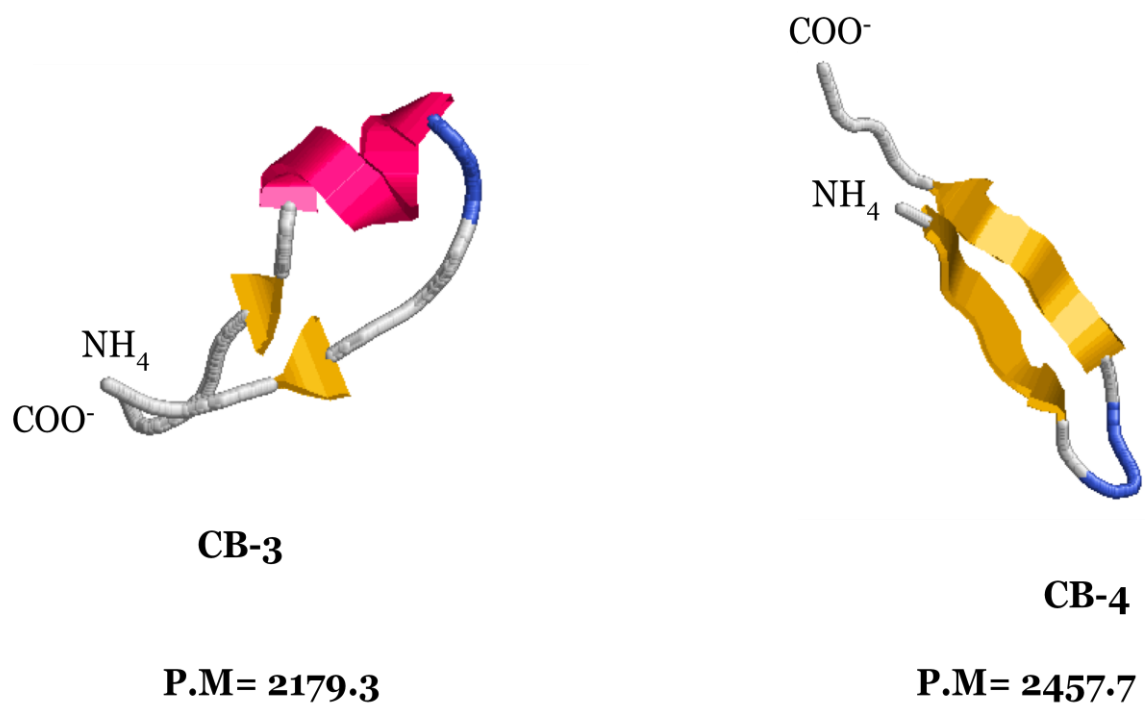
Nombre	Posición	Estructura secundaria	secuencia	carga
CB-1	193-208		PPRPPVGGARRHPTT	+ / -
CB-2	301-315		PADENPPGALPGPPG	+ / 0 / -
CB-3	364-378		FSGDAGAEQGPRPPL	- / 0 / +
CB-4	571-585		ARADHQKTLFWLPDH	+ / -
CB-5	608-623		AQATRSETPVEVLAQQ	0 / - / +
CB-6	702-718		ATCEGSTRDIEPKRLVR	- / +

 α -hélice
  β -plegado
  rizo

En la tabla anterior se puede observar la posición de los péptidos dentro de la gH de HSV-1, la estructura secundaria de los mismos, su secuencia y su carga. Los péptidos CB-1 y CB-2 se descartaron debido a que poseen una estructura secundaria de rizo, lo cual puede provocar que se plieguen sobre si mismos al encontrarse en solución debido a la carga que presentan.

Por lo tanto, únicamente quedaron cuatro péptidos (CB-3 - CB-6) a los cuales se les determinaron dos parámetros más, la estructura tridimensional de cada uno por medio de una predicción *ab initio* utilizando el programa Rosetta, para determinar si coincidía con la estructura secundaria previamente determinada

Los resultados de la predicción de estructura terciaria se muestran en la Fig. 15.



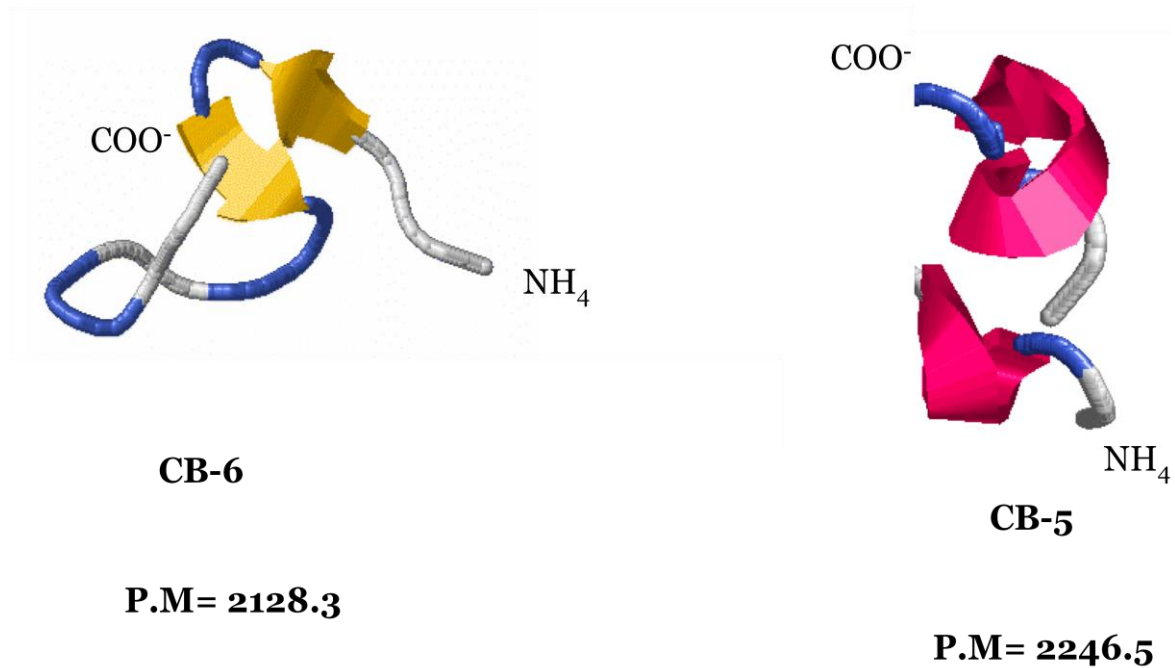


Fig 15. Predicción de la estructura tridimensional de los péptidos CB-3, CB-4, CB-5 y CB-6. En azul se muestran las estructuras de rizo, en Rosa las α -hélices y en Amarillo las tiras β -plegadas.

Una vez determinada la estructura de los péptidos se llevó a cabo un análisis BLAST para determinar si estos péptidos tenían algún homólogo remoto relacionado con funciones celulares como señalización ó crecimiento. Estos homólogos se buscaron para determinar *in silico* si los péptidos tenían alguna posibilidad de presentar toxicidad en las células debida a su participación en algún proceso celular. Los resultados del análisis BLAST se muestran en la Figura 16.

•**CB-3**

•

•gi 9629402 ref NP_044623.1 virion glycoprotein H [Human herpesv...	49	2e-05
•gi 10444402 gb AAG17895.1 glycoprotein H [human herpesvirus 1]	49	3e-05
•gi 138316 sp P08356 VGLH_HHV1E Glycoprotein H precursor >gi 3302...	49	3e-05
•gi 32892257 gb AAP89021.1 glycoprotein H [Human herpesvirus 1]	46	1e-04

•CB-4

Øgi 9629402 ref NP_044623.1 virion glycoprotein H [Human herpesv...	47	1e-04
Øgi 10444402 gb AAG17895.1 glycoprotein H [human herpesvirus 1]	47	1e-04
Øgi 138316 sp P08356 VGLH_HHV1E Glycoprotein H precursor >gi 3302...	47	1e-04

•CB-5

•

•No hay hits de Blast con valores de expectación menores a 0.001 (e < 0.001)

•

•CAB-6

•

•No hay hits de Blast con valores de expectación menores a 0.001 (e < 0.001)

Figura 16. Determinación de homólogos remotos para los péptidos CB-3, CB-4, CB-5 y CB-6 mediante el programa psi-Blast.




Ninguno de los péptidos mostró similitud con otra proteína que no fuera la Glicoproteína H de HSV-1, por lo que cualquiera de los cuatro era buen candidato para usar en los ensayos siguientes.


I.VI. Síntesis de péptidos


Se mandaron sintetizar tres péptidos, seleccionados con base en los análisis anteriores. Estos péptidos fueron el CB-3 y el CB-4 los cuales, para facilitar análisis posteriores, fueron renombrados como CB-1 y CB-2 respectivamente. Por otro lado, se decidió incluir un péptido que no cumpliera las características bioquímicas y estructurales antes mencionadas. Dicho péptido, nombrado PAT, se derivó de la porción hipervariable de la gH de HSV-1 ya que esta región es la más variable entre la gH de HSV-1 y HSV-2, además, la gH no posee una estructura definida en dicha región, probablemente porque en esta región interactúa con gL y es probable que estas interacciones le confieran estructura

a esta región de gH. Las características resumidas de los péptidos seleccionados se muestran en la tabla 4.

Tabla 4. Características de los péptidos CB-1, CB-2 y TNT.

Nombre	Posición	Estructura Secundaria	Secuencia	Carga
CB-1	364-378		EFFSGDAGAEQGPRPPLF	+ / 0 / -
CB-2	571-585		ALARADHQKTLFWLPDHF	+ / -
PAT	54-71		NTPDPQKPPRGFLAPPDE	0

 α -hélice

 β -
plegada

 rizo

III. Ensayos de citotoxicidad

Se probó la citotoxicidad de cada uno de los péptidos sintéticos (CB-1, CB-2 y PAT) en dos líneas celulares. Se seleccionó la línea celular HepG2/C3A que es una línea de hepatocarcinoma humano porque la mayoría de los fármacos que se planean para su uso en humanos deben probarse previamente en células hepáticas para medir el grado de citotoxicidad que pueden provocar en el hígado (Lawansprasert, 2001; Marotto, 2007). La otra línea celular elegida fue la línea celular Vero, ya que la propagación de HSV-1 y HSV-2 se realiza de manera común en esta línea celular, además, los ensayos de bloqueo de la infección herpética se llevaron a cabo en células Vero por lo que era importante determinar el grado de toxicidad que provocaban en dichas células.

Para probar la toxicidad de los péptidos se probaron concentraciones de cada péptido desde 50 μM hasta 0.1 μM , la toxicidad provocada por cada uno de los péptidos se midió por un ensayo de reducción de MTT. El testigo celular se tomó como el 0% de toxicidad y a partir de ese valor se calculó la toxicidad de cada péptido. Los resultados de las determinaciones de toxicidad para cada péptido se graficaron de manera conjunta y se muestran en la figura 17.

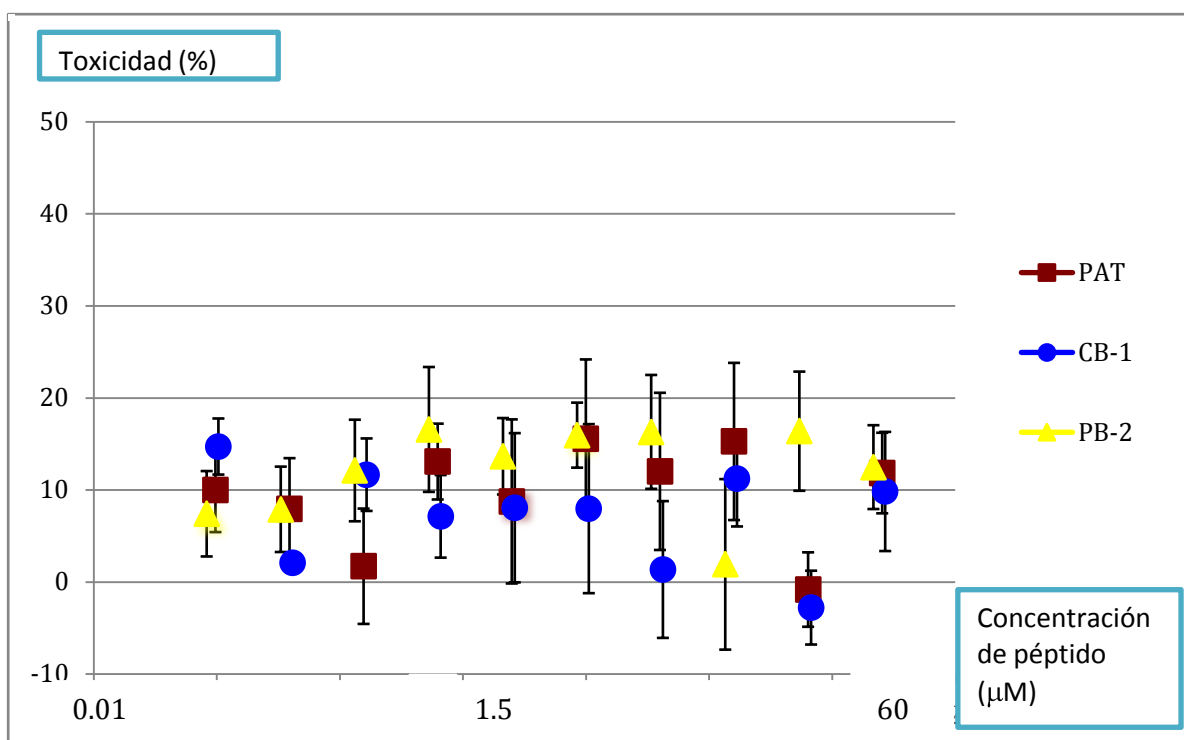


Figura 17. Gráfica de la citotoxicidad en células HepG2/C3A de los péptidos sintéticos CB-1, CB-2 y PAT.

La toxicidad observada para los péptidos sintéticos (CB-1, CB-2 y PAT) en la línea celular HepG2/C3A no excede los valores de 20%. El péptido que mostró ser más tóxico en dicha línea celular fue el péptido CB-2, alcanzando de toxicidad de aproximadamente 15% en las concentraciones que van desde 6.5 μM hasta 0.4 μM . El péptido CB-1 mostró los valores más bajos de toxicidad en

el mismo rango de concentraciones, dicha toxicidad varía entre el 1% y el 7% aproximadamente. El péptido PAT muestra valores de toxicidad constantes que varían entre el 7% y el 9% aproximadamente.

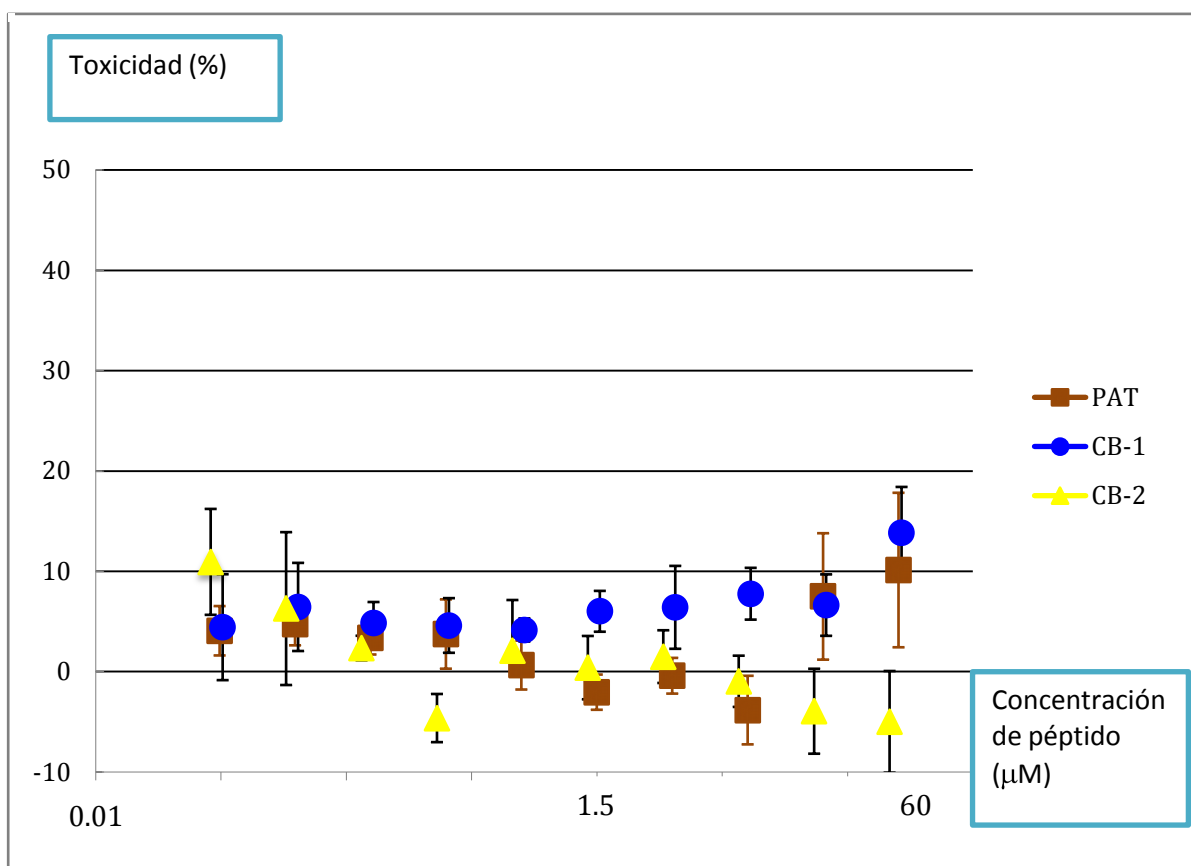


Figura 18. Gráfica de la citotoxicidad en células Vero de los péptidos sintéticos CB-1, CB-2 y PAT.

La toxicidad provocada por los péptidos en la línea celular Vero (Fig. 18) es menor a la provocada en la línea celular HepG2/C3A (Fig. 17). En términos generales se puede decir que la toxicidad no excede valores del 10% a concentraciones de los péptidos que van desde 25.3 µM hasta 0.1 µM. En dicho rango de concentraciones la toxicidad no excede valores del 10%. La concentración más tóxica para todos los péptidos (Excepto para el CB-2) es la

concentración de 50 μM en la que se observa que los péptidos PAT y CB-1 presentan una toxicidad de 15% aproximadamente.

Como era de esperarse, la toxicidad provocada por los péptidos sintéticos en la línea celular HepG2/C3A fue más alta que en la línea celular Vero debido a que las líneas de células hepáticas (HepG2/C3A) son mucho más sensibles a diversos fármacos que las líneas fibroblásticas (Vero). Sin embargo, los valores de toxicidad no son muy elevados por lo que se prosiguió a realizar los ensayos de bloqueo.

IV. Ensayos de bloqueo

Los ensayos de bloqueo se llevaron a cabo en la línea celular Vero, esto porque tanto HSV-1 como HSV-2 se multiplican efectivamente en esta línea celular. Para determinar el nivel al que actúan los péptidos sintéticos, ya sea directamente sobre el virión, o uniéndose a alguna molécula en la superficie celular, se llevaron a cabo tres tipos de ensayos distintos.

IV.I. Bloqueo directo sobre el virión

Para determinar si existían interacciones entre los péptidos sintéticos y el virión que fueran capaces de impedir la infección, se diluyeron los péptidos a las mismas concentraciones que se emplearon para los ensayos de toxicidad (50 μM -0.05 μM) y se pusieron en contacto con 100 TCID₅₀/ml de HSV-1 y HSV-2 y se incubaron durante 30 minutos a 37°C para dar tiempo suficiente a los péptidos de interactuar con el virus. Después de este tiempo de incubación se agregaron las células y las placas se incubaron a 37°C durante 48 horas, que

fue el tiempo que tardaron los testigos de virus en dar un efecto citopático completo. Los resultados de éste experimento se muestran en la figura 19.

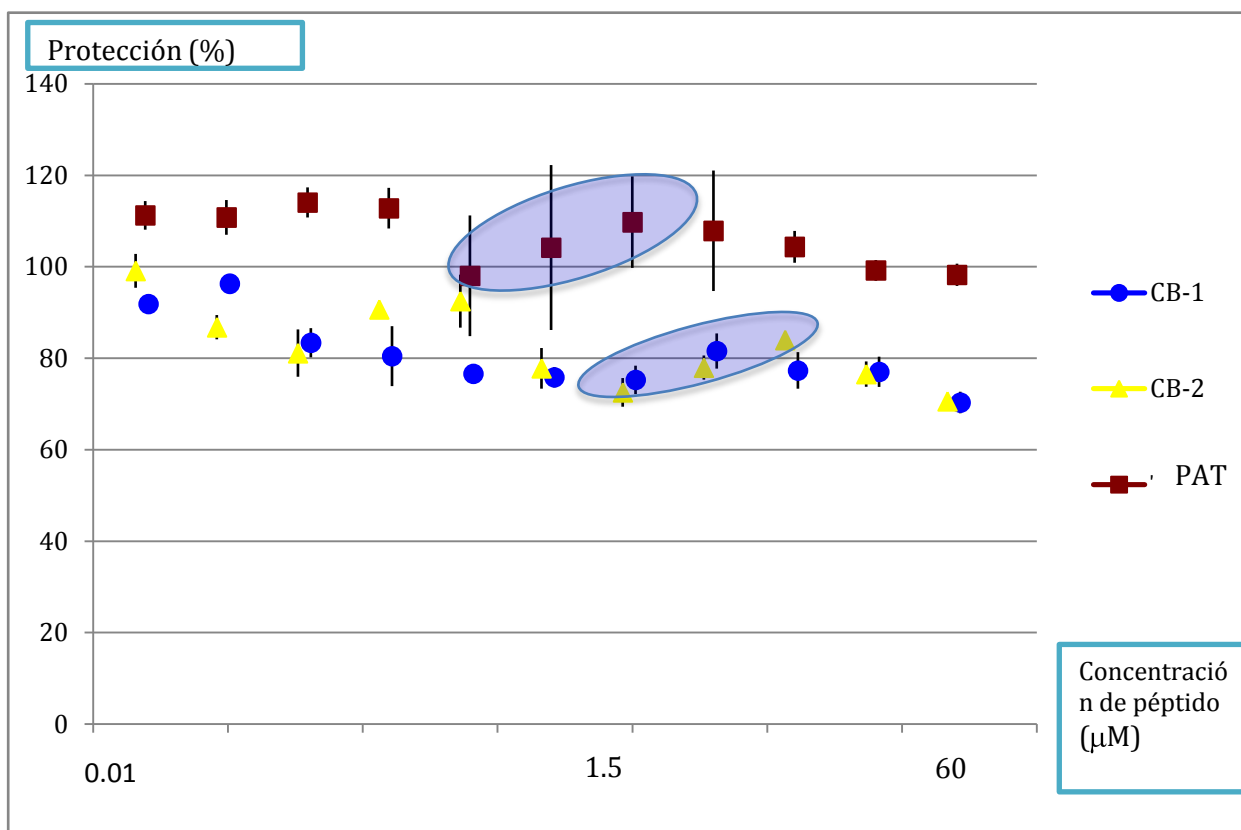


Figura 19. Gráfica del porcentaje de protección en contra de la infección por HSV-1 en la línea celular Vero debida a la acción directa sobre el virión de los péptidos CB-1, CB-2 y PAT.

Todas las concentraciones de péptido probadas en este ensayo mostraron que los tres péptidos son capaces de interferir con la infección viral., El comportamiento de los péptidos CB-1 y CB-2 presenta una tendencia lineal (dosis-respuesta) con una actividad antiviral de entre 70 y 80% entre las concentraciones de $12.5\mu\text{M}$ y $3.125\mu\text{M}$ como está marcado en la figura 19 con círculos azules. Sorprendentemente, el péptido PAT que proviene de la región hipervariable de gH mostró una respuesta lineal (dosis-respuesta) entre las concentraciones de $6.125\mu\text{M}$ y $0.8\mu\text{M}$ con una actividad antiviral de alrededor del 110%, superior a la mostrada por los péptidos CB-1 y CB-2 en el mismo

rango de concentraciones como se puede observar en la gráfica. El péptido PAT proviene de una región hipervariable de la gH de HSV-1 que no presenta una estructura secundaria definida. El bloqueo en contra de la infección herpética por este péptido puede deberse a varios factores que se discutirán más adelante.

Los resultados de este ensayo para el bloqueo de la infección por HSV-2 se muestran en la figura 20.

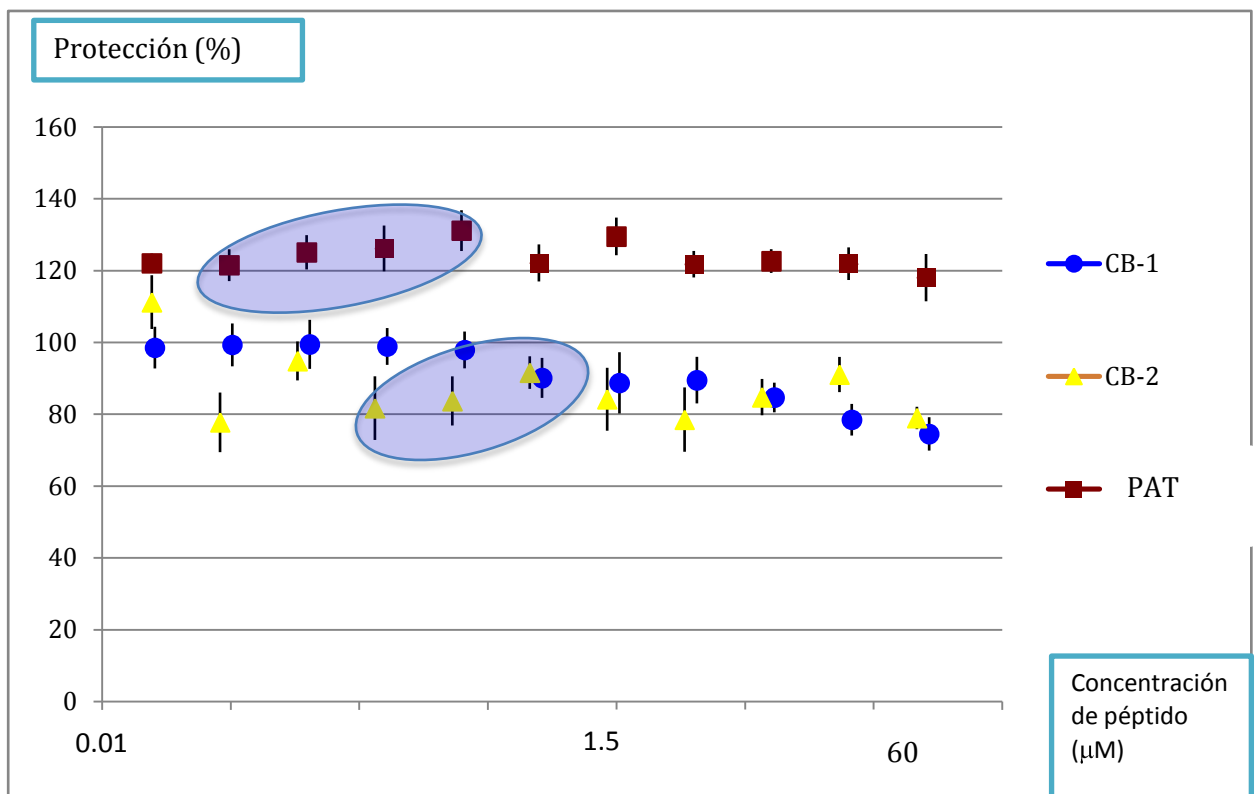


Figura 20. Gráfica del porcentaje de protección en contra de la infección por HSV-2 en la línea celular Vero debida a la acción directa sobre el virión de los péptidos CB-1, CB-2 y PAT.

De manera similar al efecto observado por los péptidos en contra de la infección por HSV-1, para HSV-2 todas las concentraciones de péptido probadas mostraron actividad antiviral. El comportamiento del péptido CB-2

presenta una tendencia lineal (dosis-respuesta) con una actividad antiviral de entre 80 y 90% entre las concentraciones de 1.125 μ M y 0.8 μ M como está marcado en la figura 20 con círculos azules. El péptido PAT mostró una respuesta lineal (dosis-respuesta) entre las concentraciones de 0.8 μ M y 0.1 μ M con una actividad antiviral de alrededor del 120%, superior a la mostrada por los péptidos CB-1 y CB-2 en el mismo intervalo de concentraciones como se puede observar en la gráfica. El péptido CB-1 no muestra tendencia lineal en ningún rango de concentraciones. La actividad mostrada por los péptidos CB-2 y PAT fue ligeramente superior a la mostrada por los mismos péptidos en contra de la infección por HSV-1.

Debido a que los péptidos CB-1 y CB-2 mostraron mayor actividad antiviral a menores concentraciones, el siguiente ensayo se llevó a cabo utilizando los péptidos diluidos a concentraciones de 6.3 μ M a 0.006 μ M.

IV.II. Ensayo de tratamiento conjunto

El siguiente ensayo consistió en probar el efecto de los péptidos sintéticos en contra de HSV-1 y HSV-2 colocando todos los componentes de la mezcla al mismo tiempo, es decir, los péptidos diluidos, el virus y las células. Este ensayo permite observar el efecto de los péptidos durante la infección. Si los péptidos no interfieren en las interacciones virus célula, permitirán el inicio de la infección (fusión de membranas con liberación de cápsides desnudas al citoplasma) y por lo tanto la infección viral será exitosa. Si por el contrario, los péptidos interfieren con las interacciones virus-célula no habrá infección viral.,

Para este ensayo se decidió bajar la concentración de virus de 100 TCID₅₀/ml a 50 TCID₅₀/ml.

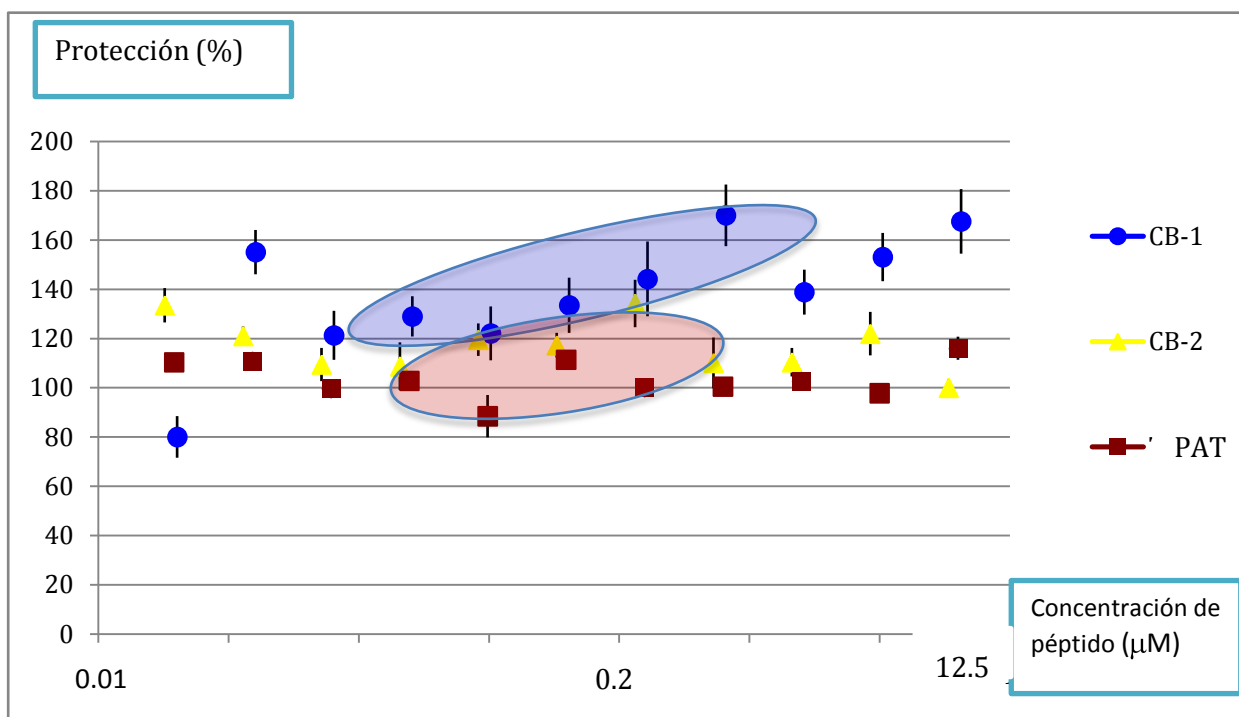


Figura 21. Gráfica del porcentaje de protección ejercida por los péptidos CB-1 y CB-2 y PAT en contra de la infección por HSV-1 por tratamiento conjunto (Virus-Péptidos-Células).

El péptido CB-1 mostró una respuesta lineal (Dosis-Respuesta) en las concentraciones de 0.7µM a 0.09 µM (Fig. 21, círculo azul). Los péptidos CB-2 y PAT mostraron una respuesta lineal entre las concentraciones de 0.36 µM a 0.09µM (Fig. 21 círculo rojo). En este ensayo el péptido CB-1 muestra una actividad antiviral máxima de entre 120 y 150% mientras que el péptido CB-2 presenta una actividad máxima de alrededor de 140%. El péptido PAT presenta actividad antiviral aunque dicha actividad es menor que la mostrada en el ensayo de bloqueo directo sobre el virus. Los péptidos CB-1 y CB-2 pueden estar actuando durante las interacciones virus-célula en la infección por HSV-1 y por este hecho presentan mayor actividad antiviral que el péptido PAT que

como ya observó anteriormente, actúa directamente sobre el virión.

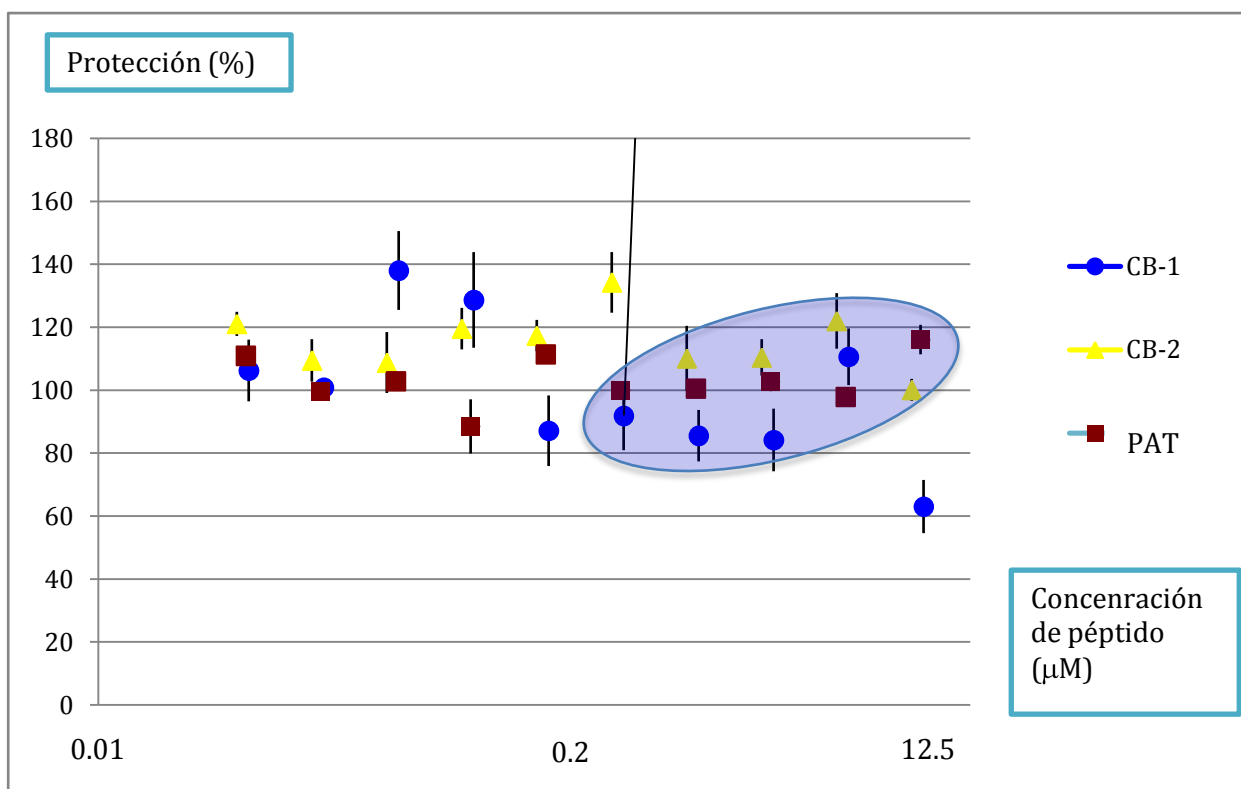


Figura 22. Gráfica del porcentaje de protección ejercida por los péptidos CB-1, CB-2 y PAT en contra de la infección por HSV-2 por tratamiento conjunto (Virus-Péptidos-Células).

En el caso de HSV-2 (Fig. 22) , los péptidos CB-1, CB-2 y PAT presentan una tendencia lineal (Dosis-Respuesta) en las concentraciones de 6.5 mM a 0.8 mM. El péptido CB-2 muestra un efecto ligeramente mayor que los otros dos con un porcentaje de protección máximo de aproximadamente 120%. La diferencia en protección entre los péptidos CB-1 y PAT no es significativa y es de aproximadamente 100%. El péptido CB-2 ejerce un efecto antiviral mayor en este ensayo en comparación con el ensayo en el que se incubó directamente con el virus. Es probable, al igual que sucede con HSV-1 que el péptido CB-2 interfiera con las interacciones virus-célula cuando inicia la infección por HSV-2.

IV.III. Tratamiento sobre las células.

Ninguno de los péptidos (CB-1, CB-2 y PAT) mostraron actividad antiviral elevada en este ensayo. En el caso de la infección por HSV-1 (Fig. 23), ninguno de los tres péptidos superó el 30% de actividad antiviral en comparación a los otros dos ensayos en los que la actividad antiviral rebasa los niveles del 80%. Al lavar los péptidos de la superficie celular se elimina la mayoría del péptido que no interactúa con las células. El efecto antiviral observado puede deberse a péptido residual que no se haya eliminado durante los lavados o que se haya pegado a la superficie celular y que haya sido capaz de bloquear la infección.

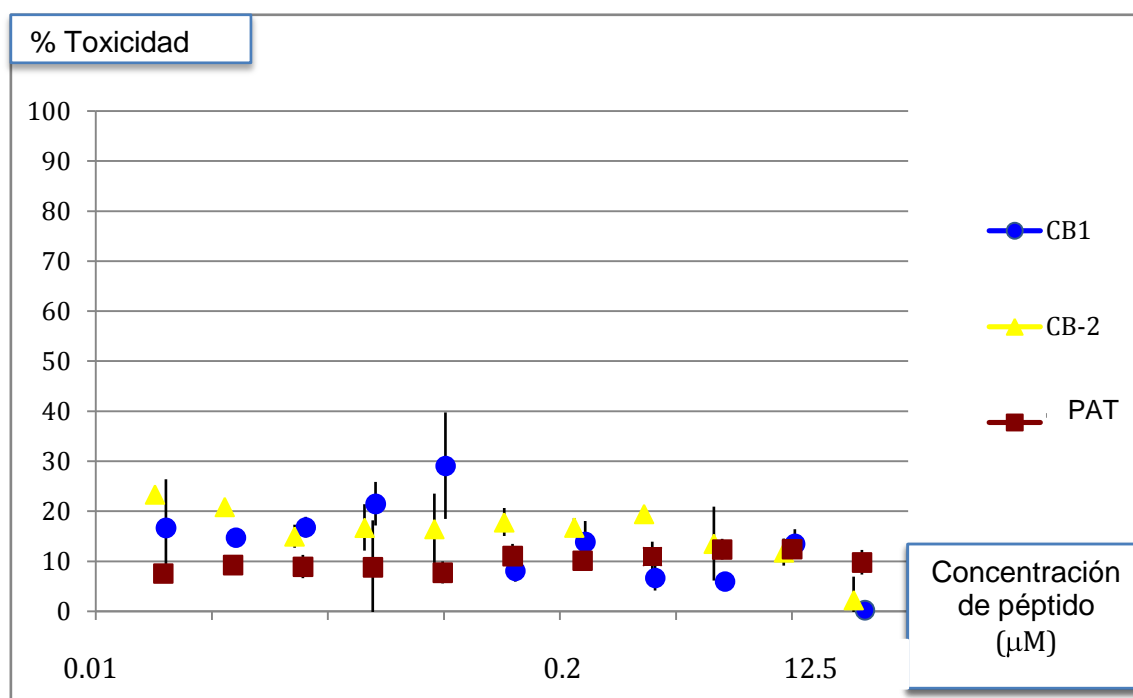


Figura 23. Gráfica del porcentaje de protección ejercida por los péptidos CB-1, CB-2 y PAT en contra de la infección por HSV-1 por tratamiento previo de las células.

En el caso de HSV-2 ocurre un efecto similar al ocurrido para HSV-1 como se puede observar en la figura 24.

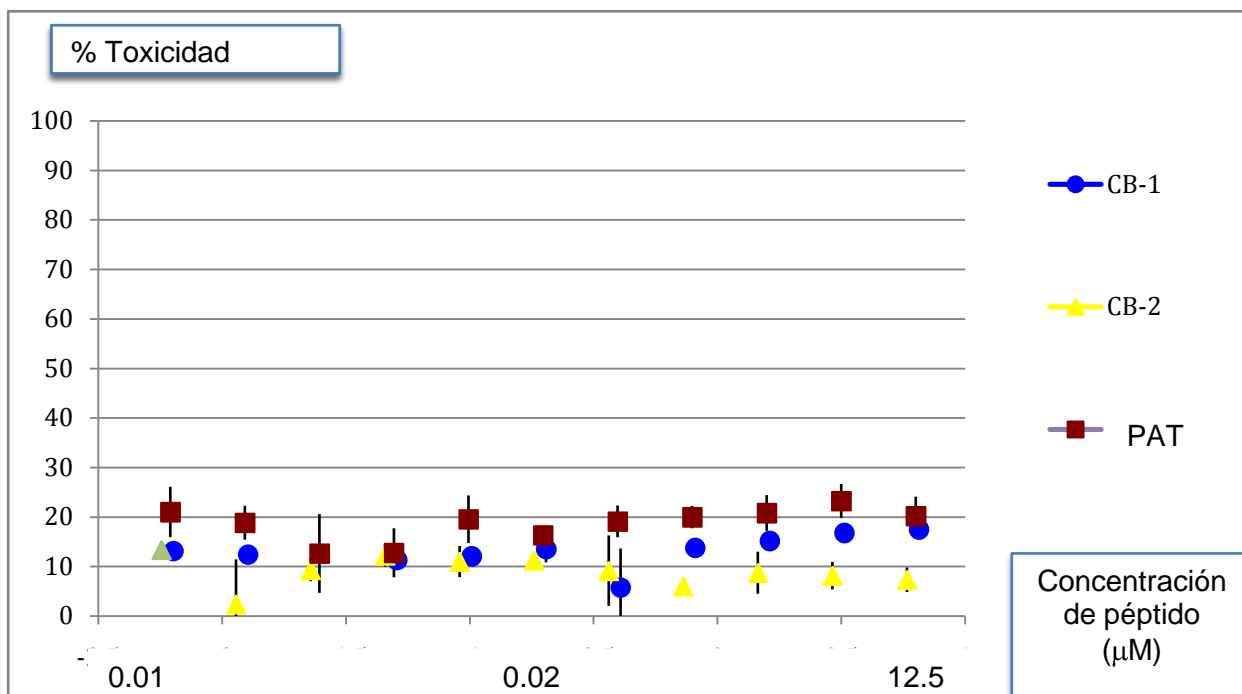


Figura 24. Gráfica del porcentaje de protección ejercida por los péptidos CB-1, CB-2 y PAT en contra de la infección por HSV-2 por tratamiento previo de las células.

Para este ensayo se puede observar que la actividad antiviral baja drásticamente, además, no se presenta una tendencia lineal (Dosis-Respuesta) para ninguno de los péptidos probados. Esto indica claramente que el efecto de péptidos no es a nivel celular, sino en las interacciones virus-célula y directamente sobre el virión.

IV.IV. Tratamiento con Aciclovir

Para comparar la efectividad de los péptidos se llevó a cabo un ensayo de inactivación utilizando Aciclovir. Este medicamento es el más utilizado en

contra de las infecciones por HSV-1 y HSV-2 por lo que se comparó su efectividad con la de los péptidos. Los resultados del tratamiento con Aciclovir se muestran en la figura 25.

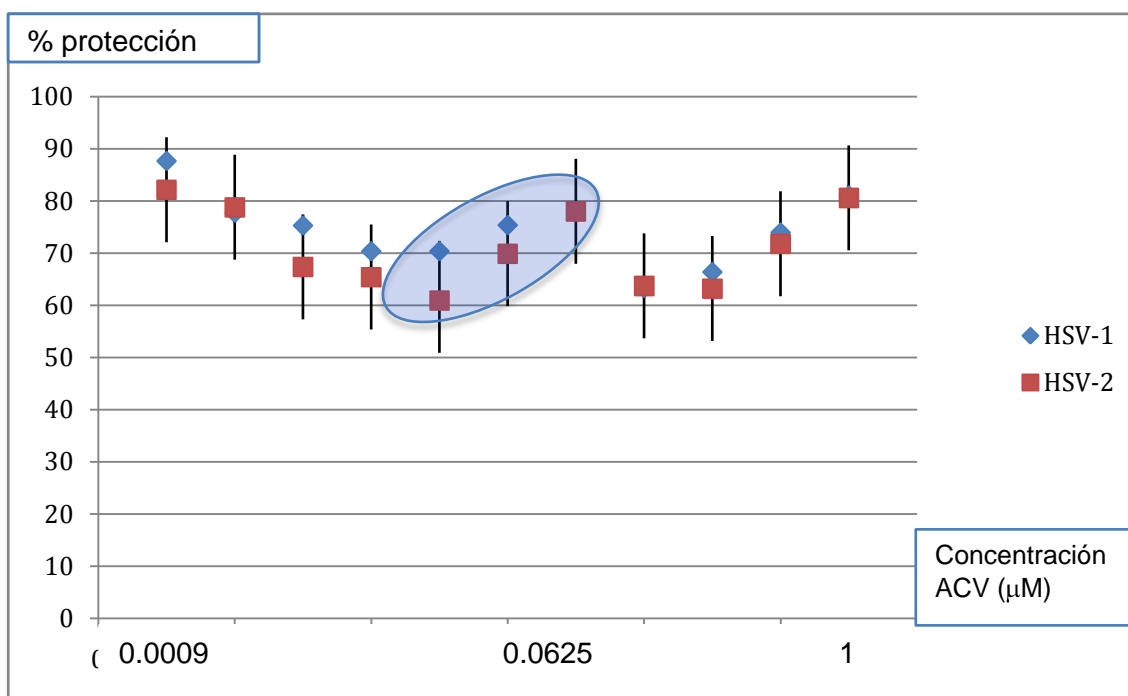


Figura 25. Gráfica del porcentaje de protección ejercida por Aciclovir en contra de la infección por HSV-2.

El Aciclovir muestra una respuesta lineal (Dosis-Respuesta) (Círculo azul figura 25) en concentraciones que van desde 0.0635 μM hasta 0.001 μM contra 100 TCID₅₀/ ml de HSV-1 y HSV-2. El efecto antiviral en estas concentraciones es aproximadamente de 70%. Los péptidos sintéticos probados mostraron niveles mayores de protección a concentraciones más altas. El Aciclovir actúa a concentraciones más bajas que los péptidos, sin embargo los péptidos presentan buenos niveles de protección a bajas concentraciones también.

DISCUSIÓN

El reciente brote de influenza porcina (H1N1) en países como México y Estados Unidos (CDC, 2009) ha dejado muchas lecciones importantes a los investigadores alrededor del mundo. La resistencia desarrollada por distintas cepas del virus de influenza a los antivirales usados comúnmente como la Amantadina que es un inhibidor del canal de protones (M2) (Saito, 2003), muestra la capacidad de los virus para evadir los intentos del hombre por combatirlos. Estos eventos y la resistencia a distintos antivirales que han desarrollado otros virus como el HSV-1 (Coen, 1980), hace urgente el desarrollo de nuevas terapias antivirales efectivas y eficaces para combatir las infecciones virales. Este trabajo planteó la aplicación de técnicas bioinformáticas de punta para desarrollar péptidos sintéticos con los cuales sea posible tratar las infecciones herpéticas.

La mejor manera de combatir las infecciones virales es evitando la infección, es decir, impidiendo que los virus entren a su célula hospedera. Existe un inhibidor de entrada, aprobado por la FDA, para el HIV-1 con el nombre comercial de Enfuvirtide (Roche, 2005). Este inhibidor de entrada es un péptido sintético que se une directamente al intermediario que forma la proteína de fusión de dicho virus justo antes de fusionar su membrana con la de la célula hospedera para iniciar la infección.

La serie de interacciones entre las glicoproteínas involucradas en la fusión de membranas de los herpesvirus (gD, gB y gH) que permiten la entrada de éstos a su célula hospedera fue el blanco para el diseño de los péptidos sintéticos propuestos en este estudio. La glicoproteína H de los herpesvirus está ampliamente estudiada y sus relaciones con la fusión de membranas (necesaria para establecer la infección) son evidentes (Gianni, 2005; Gianni, 2005; Gianni, 2006). Dado que las interacciones entre gH y las otras dos glicoproteínas involucradas en la fusión de membranas son esenciales para completar este proceso (Maurer, 2008), se pensó que al derivar péptidos de gH se podrían bloquear estas interacciones impidiendo así la fusión.

Las interacciones entre proteínas son una de las áreas de la bioquímica más difíciles de estudiar. Muchos investigadores se han dado a la tarea de determinar qué parámetros determinan estas interacciones, los tipos de enlaces que se forman en las interfaces de dos proteínas que interactúan y las características de los residuos que se encuentran en estas interfaces (Keskin, 2004). Uno de los parámetros más importantes que deben cumplirse dentro de las interacciones proteína-proteína es que las superficies que van a interactuar estén expuestas, es decir, que se encuentren localizadas en la superficie de la proteína. En estas regiones se pueden encontrar residuos hidrofílicos como serina, glutamina y lisina (Ma, 2003; Caffrey, 2004). Otros residuos involucrados en las interacciones proteína-proteína son aromáticos como el triptófano y la fenilalanina. (Arkin, 2004; Ma, 2003). Residuos como prolina y glicina también se pueden encontrar en sitios de interacción, probablemente

porque generan cambios en la estructura secundaria de dichos sitios (Caffrey, 2004; Keskin, 2005).

Con ayuda de herramientas bioinformáticas se determinaron una serie de parámetros bioquímicos de gH con el fin de buscar aquellas regiones que pudieran estar involucradas en las interacciones necesarias para completar la fusión de membranas. Se hizo una búsqueda de regiones hidrofílicas para determinar porciones de la proteína que están expuestas; de regiones antigénicas, las cuales se encuentran expuestas también y además están asociadas con interacciones antígeno-anticuerpo (proteína-proteína). Por último se determinó la flexibilidad de cadena ya que también se sabe que las regiones más flexibles en las proteínas tienden a interactuar más fácilmente (Schlessinger, 2006). Se encontró que la gH de HSV-1 posee por lo menos 11 regiones expuestas y altamente flexibles que podrían interactuar con gB y gD.

Las predicciones de estructura secundaria demostraron que la gH de HSV-1 y HSV-2 son muy similares en estructura, lo que nos llevó a diseñar péptidos derivados de la gH de HSV-1 con los cuales fuera posible bloquear la infección tanto por HSV-1 como por HSV-2. Para esto, de las 11 regiones antes mencionadas se hizo una selección de aquellas en las que la estructura secundaria de la gH de HSV-1 y HSV-2 fuera similar. Se encontró que existen aproximadamente ocho regiones que cumplían todos los parámetros buscados (exposición, flexibilidad y estructura).

Las interacciones entre proteínas son, en su mayoría, interacciones débiles entre las que se encuentran atracciones y repulsiones hidrofóbicas y fuerzas electrostáticas (Keskin, 2005). Por este hecho nos dimos a la tarea de investigar si las ocho regiones encontradas eran capaces de interactuar con otras proteínas gracias a su carga. Para lo cual se determinó la carga de la gH de HSV-1 y se seleccionaron, a partir de las ocho regiones encontradas previamente, solo aquellas en las que la proteína presentaba carga. En total se encontraron seis regiones que podrían estar involucradas en las interacciones necesarias para la fusión (Tabla 3). Aunque dos de estas regiones se descartaron porque poseían estructura de rizo (lo que podría provocar que se enrollaran al encontrarse en solución), cualquiera de las seis regiones puede estar involucrada en las interacciones ya mencionadas. De un total de 11 regiones con probabilidad de interactuar con otras proteínas se encontró que cuatro eran las que cumplían todos los requisitos planteados, por lo que de estas regiones se escogieron los péptidos a probar.

En la tabla 4 se puede observar la secuencia de los péptidos seleccionados los cuales poseen la mayoría de los residuos importantes para las interacciones proteína-proteína. Estos residuos (Phe, Trp, Ser, Glu, Lys) están presentes en los péptidos CB-1 y CB-2 en diferentes cantidades, además, estos péptidos también poseen Pro y Gly que son los residuos asociados con la estructura de los sitios de interacción (Keskin, 2004; Ma, 2003; Caffrey, 2004). El péptido PAT también presenta algunos de estos residuos, sin embargo, presenta una estructura secundaria de rizo y no proviene de una región altamente expuesta de la gH de HSV-1.

La caracterización *in silico* de estos péptidos, mediante predicciones *ab initio* utilizando el programa Rosetta (Rohl,2002) mostró que todos los péptidos tienen una estructura terciaria definida. Dicha estructura no correlaciona en su totalidad con la estructura secundaria determinada con PSIPRED, cabe mencionar que la estructura terciaria de los péptidos que se propone en este trabajo es una predicción y que existe la posibilidad que la estructura de los péptidos sea distinta a la propuesta. Por otro lado, se encontró que los únicos homólogos remotos para los péptidos están relacionados con la gH de los herpesvirus lo que reduce la probabilidad de que interactúen con algún componente celular.

Los estudios anteriores son una demostración de que la bioinformática puede aplicarse exitosamente a sistemas biológicos. Los datos de las predicciones de hidrofobicidad y antigenicidad correlacionan de manera significativa como se muestra en la figura 11. Las regiones antigénicas generalmente son altamente hidrofílicas, es decir, están expuestas. Por otro lado, las zonas flexibles no necesariamente están expuestas y por otro lado hay zonas expuestas que son sumamente rígidas. Gracias a estas observaciones se escogieron únicamente las regiones expuestas y flexibles en la gH de HSV-1. Los análisis estructurales refinaron el proceso de selección y permitieron escoger los tres péptidos con los cuales se buscó bloquear la infección por HSV-1 y HSV-2 *in vitro*.

Los péptidos sintéticos que se seleccionaron provienen de distintas porciones de la gH de HSV-1. El péptido CB-1 proviene de una región localizada entre los residuos 300 y 400 de dicha glicoproteína. Trabajos previos realizados en

nuestro laboratorio (Torres, 2007) mostraron que en esta zona se encuentra una región con altas probabilidades de insertarse en la membrana lo que podría conferirle la capacidad de actuar como péptido de fusión. El péptido CB-2 proviene de una región localizada entre los residuos 500 y 600 de la gH. En esta región se encuentra una de las zonas capaces de formar estructuras de “coiled-coil” (Gianni, 2005; Gianni, 2006) las cuales son importantes en otras proteínas virales de fusión como la hemaglutinina del virus de la Influenza y la gp41 de HIV. El péptido PAT por otro lado proviene de una región cercana al amino terminal de la gH de HSV-1. En esta región es en donde la gH interactúa con la gL (Peng, 1998).

Antes de empezar con los ensayos de bloqueo de los péptidos era importante determinar la toxicidad de los mismos. Muchos medicamentos pueden provocar toxicidad en el hígado por distintos mecanismos (González de Requena, 2002), por lo cual una de las dos líneas celulares escogidas para llevar a cabo pruebas de toxicidad fue la línea celular de hepatocarcinoma HepG2/C3A. La otra línea celular utilizada, la línea de riñón de mono verde africano (Vero) se escogió por la alta capacidad que tienen HSV-1 y HSV-2 para propagarse eficientemente en dicha línea.

Se encontró que la toxicidad provocada por los tres péptidos escogidos (CB-1, CB-2 y PAT) a la más alta concentración probada (50 μ M) es menor al 20%. Estos niveles de toxicidad son bajos en comparación con otros fármacos antivirales como el AZT, utilizado contra HIV, que provoca toxicidades de aproximadamente 50% a las mismas concentraciones (Soudeyns, 1991). A

diferencia del AZT que es un medicamento muy utilizado contra HIV, el péptido anti-HIV, Enfuvirtide, provoca bajos niveles de toxicidad y su único efecto adverso es una reacción de tipo alérgico en el sitio de inoculación cuando se administra en grandes cantidades (Church, 2004). El Aciclovir, que es el medicamento más usado contra las infecciones herpéticas, es poco soluble en agua y puede provocar neurotoxicidad y falla renal en pacientes a los que se les administra por vía intravenosa en altas cantidades (Ernst,1998), lo cuál es común en pacientes inmunosuprimidos que presentan infecciones herpéticas sistémicas. Esto habla de la ventaja de usar péptidos sintéticos para tratar las infecciones virales. Ya que una de las complicaciones más importantes de las infecciones herpéticas son las infecciones sistémicas y del SNC, la baja toxicidad que mostraron los péptidos probados en este estudio es alentadora ya que podría permitir su uso para tratar este tipo de infecciones con menos reacciones adversas que el Aciclovir.

Para determinar si los péptidos eran capaces de interactuar directamente con algún componente del virus para impedir la infección, se incubaron los péptidos con el virus observándose un efecto dosis-respuesta con los tres péptidos probados, lo que fue sorprendente para el péptido PAT el cual, como ya se mencionó en repetidas ocasiones, no cumple con las características tomadas en cuenta para el diseño de los péptidos CB-1 y CB-2. El péptido PAT mostró un mayor efecto antiviral (alrededor del 110%) que los péptidos CB-1 y CB-2 (70-80 % de actividad antiviral).

El péptido PAT se derivó de una región hipervariable de la gH de HSV-1 que se encuentra hacia el extremo amino terminal de la proteína. Es en esta región donde gH interactúa con la glicoproteína L (Peng, 1998) mediante interacciones electrostáticas. No se sabe todavía la función que gL tiene durante el plegamiento de gH, se cree que gL es una chaperona que favorece el plegamiento correcto de gH (Hutchinson, 1992). El péptido PAT podría estar uniéndose al complejo gH-gL bloqueando así la infección. Las interacciones que lleva a cabo el péptido PAT con HSV-1 y HSV-2 necesitan investigarse a profundidad para descifrar el mecanismo de bloqueo que lleva a cabo. Ya que los péptidos CB-1 y CB-2 no presentan un efecto antiviral tan alto como el de PAT en este ensayo, se puede suponer que CB-1 y CB-2 no ejercen su efecto antiviral actuando directamente sobre el virus.

Para determinar si los péptidos impedían la infección al bloquear las interacciones entre gH y las demás proteínas involucradas en la fusión, se colocaron simultáneamente, los péptidos, el virus y las células.

Para la infección con HSV-1, los péptidos CB-1 y CB-2 mostraron un mayor efecto antiviral. Dichos péptidos también mostraron un efecto dosis respuesta. Conjuntando estos datos con los del tratamiento del virus con los péptidos, se puede proponer que estos péptidos (CB-1 y CB-2) no interactúan directamente sobre el virión sino que actúan una vez iniciada la infección. Como ya se mencionó, los péptidos CB-1 y CB-2 provienen, el primero de una región cercana al posible péptido de fusión y el segundo de una región capaz de formar "coiled-coils". Estas regiones están involucradas en la fusión por lo que

es posible que su mecanismo de acción sea interferir con la fusión. Esto provoca que su actividad antiviral sea mucho más alta al colocar todos los componentes del sistema (virus-células-péptidos) juntos. En comparación, el péptido PAT mostró una menor actividad antiviral (alrededor del 90%) y esto puede ser un indicativo más de que PAT interactúa sobre el virión mientras que CB-1 y CB-2 actúan a nivel de fusión entre HSV-1 y su célula hospedera

Para la infección por HSV-2 se observó que los péptidos CB-1 y CB-2 también ejercían un mayor efecto antiviral en el ensayo conjunto que al preincubarse con el virus. Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre el efecto ejercido por el péptido PAT y los otros dos péptidos. En general HSV-2 es más sensible a los efectos antiherpéticos aunque en este caso los péptidos son mas efectivos contra HSV-1 porque provienen de la gH de HSV-1. Es posible que haya que hacer modificaciones a los péptidos para mejorar su actividad en contra de HSV-2, aún así, la actividad que mostraron en contra de HSV-2 es superior al 80% lo cual se considera aceptable.

Hubiera sido conveniente escoger un péptido sintetizado al azar, es decir, con residuos aleatorios, para utilizarse como testigo negativo. También podría usarse un polipéptido de un mismo aminoácido como poli-prolina.

Al preincubar los péptidos con las células antes de agregar el virus se observó que no hay un efecto antiviral significativo. Es importante mencionar que las células tratadas con péptido se lavaron antes de añadir el virus para eliminar todo el péptido que no se pegara a la superficie celular. Esto sugiere que

ninguno de los péptidos interacciona fuertemente con algún componente celular para impedir la infección.

Los ensayos con Aciclovir mostraron que este medicamento es efectivo aún a concentraciones muy bajas (0.009 μM). El aciclovir muestra efecto dosis respuesta a concentraciones tan bajas como 0.01 μM . Los péptidos sintéticos por otro lado requirieron concentraciones de entre 0.3 μM y 12.5 μM , para inhibir 100 TCID₅₀/ml.

El Aciclovir y otros análogos de guanosina utilizados contra las infecciones herpéticas (Penciclovir) actúan sobre la DNA polimerasa viral inhibiéndola de manera específica. Los péptidos diseñados en este estudio tienen un blanco diferente al de los antivirales comúnmente utilizados. Aunque la actividad del Aciclovir es ligeramente mejor, los péptidos mostraron una actividad antiviral alta tanto contra HSV-1 y HSV-2. Los péptidos sintéticos pueden modificarse para mejorar su actividad por lo que los resultados obtenidos en este estudio son alentadores. El hecho de que los péptidos actúen sobre un blanco totalmente distinto al que atacan otros antivirales como el Aciclovir puede permitir el uso simultáneo de ambos antivirales, reduciendo así el riesgo de selección de cepas resistentes. El uso simultáneo de ambos antivirales también podría permitir la utilización de menores dosis de fármacos lo que traería como consecuencia directa menos efectos adversos.

CONCLUSIONES

- Se diseñaron tres péptidos sintéticos (CB-1, CB-2 y PAT) capaces de bloquear la infección por HSV-1 y HSV-2 *in vitro*.
- Los péptidos CB-1 y CB-2 se seleccionaron a partir de 11 regiones de la gH de HSV-1 que estaban expuestas y poseían flexibilidad elevada
- Los péptidos sintéticos no mostraron niveles de toxicidad superiores al 20% en las líneas celulares HepG2/C3A y Vero y mostraron actividades antivirales superiores al 80% en un intervalo de concentraciones de 0.3 μ M a 12.5 μ M.
- El péptido PAT mostró actividad antiviral al incubarse directamente con el virus lo que podría indicar que interactúa directamente con el virión.
- Los péptidos CB-1 y CB-2 mostraron mayor actividad antiviral durante el ensayo conjunto lo que podría indicar su acción directa sobre el mecanismo de fusión.
- Los péptidos sintéticos mostraron un efecto antiviral comparable al del Aciclovir.

PERSPECTIVAS

Los péptidos diseñados en este trabajo mostraron su efectividad en contra de la infección por HSV-1 y HSV-2. Una sorpresa fue el hecho de que el péptido que originalmente se planteó para ser testigo negativo (PAT) mostró actividad antiviral también. Sería interesante analizar por qué dicho péptido posee actividad antiviral (independiente al hecho de que también está derivado de gH). Los otros dos péptidos diseñados también mostraron actividad antiviral y sería sumamente interesante determinar los mecanismos de acción de dichos péptidos.

Otro campo de estudio muy grande derivado de esta investigación es determinar los efectos que los péptidos diseñados tienen sobre la infección herpética *in vivo*. Se necesita investigar si los péptidos pueden despertar una respuesta inmune y de no hacerlo habría que hacer estudios para determinar las vías de inoculación, las dosis y la vía de administración que habría que usar para su aplicación como terapia antiherpética.

Este trabajo abre un campo de estudio muy grande para el uso de péptidos sintéticos para el desarrollo de nuevas terapias antivirales contra diferentes virus, dirigidas contra blancos que no se encuentran caracterizados en su totalidad, como fue en el caso de este trabajo, la fusión de membranas de los herpesvirus.

BIBLIOGRAFÍA

- Arkin, M. R., Wells, J. A. 2004. Small-molecule inhibitors of protein-protein interactions: progressing towards the dream. *Nat Rev Drug Discov.* 3(4), 301-17.
- Atanasiu, D., Whitbeck, J. C., Cairns, T. M., Reilly, B., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. 2007. Bimolecular complementation reveals that glycoproteins gB and gH/gL of herpes simplex virus interact with each other during cell fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104(47), 18718-23.
- Avitabile, E., Forghieri, C., Campadelli-Fiume, G. 2007. Complexes between herpes simplex virus glycoproteins gD, gB, and gH detected in cells by complementation of split enhanced green fluorescent protein. *J Virol.* 81(20), 11532-7.
- Backovic, M., Longnecker, R., Jardetzky, T. S. 2009. Structure of a trimeric variant of the Epstein-Barr virus glycoprotein B. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 106(8), 2880-5.
- Bai, F., Town, T., Pradhan, D., Cox, J., Ashish, Ledizet, M., Anderson, J. F., Flavell, R. A., Krueger, J. K., Koski, R. A., Fikrig, E. 2007. Antiviral peptides targeting the west nile virus envelope protein. *J Virol.* 81(4), 2047-55.
- Barron, B. L. 1998. *Manual de Pr-cticas de Virología.* Grupo Noriega, MÈxico DF.
- Beauman, J. G. 2005. Genital herpes: a review. *Am Fam Physician.* 72(8), 1527-34.
- Brighty, D. W., Jassal, S. R. 2001. The synthetic peptide P-197 inhibits human T-cell leukemia virus type 1 envelope-mediated syncytium formation by a mechanism that is independent of Hsc70. *J Virol.* 75(21), 10472-8.

- Browne, H., Bruun, B., Minson, T. 2001. Plasma membrane requirements for cell fusion induced by herpes simplex virus type 1 glycoproteins gB, gD, gH and gL. *J Gen Virol.* 82(Pt 6), 1419-22.
- Büchen-Osmond, C. 2003. Taxonomy and Classification of Viruses. In "Manual of Clinical Microbiology" (J. Kerr, Eds.), Vol. 2. ASM Press. pp. 1217-1226.
- Bultmann, H., Brandt, C. R. 2002. Peptides containing membrane-transiting motifs inhibit virus entry. *J Biol Chem.* 277(39), 36018-23.
- Bultmann, H., Busse, J. S., Brandt, C. R. 2001. Modified FGF4 signal peptide inhibits entry of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 75(6), 2634-45.
- Bystroff, C., Shao, Y. 2002. Fully automated ab initio protein structure prediction using I-SITES, HMMSTR and ROSETTA. *Bioinformatics.* 18 Suppl 1, S54-61.
- Caffrey, D. R., Somaroo, S., Hughes, J. D., Mintseris, J., Huang, E. S. 2004. Are protein-protein interfaces more conserved in sequence than the rest of the protein surface? *Protein Sci.* 13(1), 190-202.
- Carfi, A., Willis, S. H., Whitbeck, J. C., Krummenacher, C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Wiley, D. C. 2001. Herpes simplex virus glycoprotein D bound to the human receptor HveA. *Mol Cell.* 8(1), 169-79.
- "CDC Telebriefing on Investigation of Human Cases of H1N1 Flu May 15, 2009". U.S. Centers for Disease Control and Prevention. 2009-05-15. <http://www.cdc.gov/media/transcripts/2009/t090515.htm>. Retrieved on 2009-05-21.
- Cocchi, F., Fusco, D., Menotti, L., Gianni, T., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., Campadelli-Fiume, G. 2004. The soluble ectodomain of herpes simplex virus gD contains a membrane-proximal pro-fusion domain and suffices to mediate virus entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101(19), 7445-50.

- Coen, D. M., Schaffer, P. A. 1980. Two distinct loci confer resistance to acycloguanosine in herpes simplex virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77(4), 2265-9.
- Colman, P. M., Lawrence, M. C. 2003. The structural biology of type I viral membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4(4), 309-19.
- Connolly, S. A., Landsburg, D. J., Carfi, A., Wiley, D. C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. 2003. Structure-based mutagenesis of herpes simplex virus glycoprotein D defines three critical regions at the gD-HveA/HVEM binding interface. *J Virol.* 77(14), 8127-40.
- Connolly, S. A., Landsburg, D. J., Carfi, A., Wiley, D. C., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H. 2002. Structure-based analysis of the herpes simplex virus glycoprotein D binding site present on herpesvirus entry mediator HveA (HVEM). *J Virol.* 76(21), 10894-904.
- Corey, N., Wald, A. 1999. Genital Herpes. In "Sexually Transmitted Disease" (K. Holmes, F. Sparding, M. P., L. S., Eds.), Vol. 1. McGraw Hill. pp. 527-570.
- Cuff, J. A., Barton, G. J. 2000. Application of multiple sequence alignment profiles to improve protein secondary structure prediction. *Proteins.* 40(3), 502-11.
- Christophers, J., Clayton, J., Craske, J., Ward, R., Collins, P., Trowbridge, M., Darby, G. 1998. Survey of resistance of herpes simplex virus to acyclovir in northwest England. *Antimicrob Agents Chemother.* 42(4), 868-72.
- Church, J. A., Hughes, M., Chen, J., Palumbo, P., Mofenson, L. M., Delora, P., Smith, E., Wiznia, A., Hawkins, E., Sista, P., Cunningham, C. K. 2004. Long term tolerability and safety of enfuvirtide for human immunodeficiency virus 1-infected children. *Pediatr Infect Dis J.* 23(8), 713-8.
- Davison, A. J., Eberle, R., Ehlers, B., Hayward, G. S., McGeoch, D. J., Minson, A.

- C., Pellett, P. E., Roizman, B., Studdert, M. J., Thiry, E. 2009. The order Herpesvirales. *Arch Virol.* 154(1), 171-7.
- Deszcz, L., Cencic, R., Sousa, C., Kuechler, E., Skern, T. 2006. An antiviral peptide inhibitor that is active against picornavirus 2A proteinases but not cellular caspases. *J Virol.* 80(19), 9619-27.
- Durell, S. R., Martin, I., Ruyschaert, J. M., Shai, Y., Blumenthal, R. 1997. What studies of fusion peptides tell us about viral envelope glycoprotein-mediated membrane fusion (review). *Mol Membr Biol.* 14(3), 97-112.
- Earp, L. J., Delos, S. E., Park, H. E., White, J. M. 2005. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 285, 25-66.
- Egelhofer, M., Brandenburg, G., Martinius, H., Schult-Dietrich, P., Melikyan, G., Kunert, R., Baum, C., Choi, I., Alexandrov, A., von Laer, D. 2004. Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 entry in cells expressing gp41-derived peptides. *J Virol.* 78(2), 568-75.
- Elion, G. B. 1993. Acyclovir: discovery, mechanism of action, and selectivity. *J Med Virol. Suppl* 1, 2-6.
- Englund, J. A., Zimmerman, M. E., Swierkosz, E. M., Goodman, J. L., Scholl, D. R., Balfour, H. H., Jr. 1990. Herpes simplex virus resistant to acyclovir. A study in a tertiary care center. *Ann Intern Med.* 112(6), 416-22.
- Ernst, M. E., Franey, R. J. 1998. Acyclovir- and ganciclovir-induced neurotoxicity. *Ann Pharmacother.* 32(1), 111-3.
- Fauquet, C. M., Mayo, M. A., Maniloff, J., Desselberger, U., Ball, L. A. 2005. *Virus Taxonomy: VIIIth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Elsevier Academic Press.
- Gaudreau, A., Hill, E., Balfour, H. H., Jr., Erice, A., Boivin, G. 1998. Phenotypic and

- genotypic characterization of acyclovir-resistant herpes simplex viruses from immunocompromised patients. *J Infect Dis.* 178(2), 297-303.
- Gerber, S. I., Belval, B. J., Herold, B. C. 1995. Differences in the role of glycoprotein C of HSV-1 and HSV-2 in viral binding may contribute to serotype differences in cell tropism. *Virology.* 214(1), 29-39.
- Gianni, T., Fato, R., Bergamini, C., Lenaz, G., Campadelli-Fiume, G. 2006a. Hydrophobic alpha-helices 1 and 2 of herpes simplex virus gH interact with lipids, and their mimetic peptides enhance virus infection and fusion. *J Virol.* 80(16), 8190-8.
- Gianni, T., Martelli, P. L., Casadio, R., Campadelli-Fiume, G. 2005a. The ectodomain of herpes simplex virus glycoprotein H contains a membrane alpha-helix with attributes of an internal fusion peptide, positionally conserved in the herpesviridae family. *J Virol.* 79(5), 2931-40.
- Gianni, T., Menotti, L., Campadelli-Fiume, G. 2005b. A heptad repeat in herpes simplex virus 1 gH, located downstream of the alpha-helix with attributes of a fusion peptide, is critical for virus entry and fusion. *J Virol.* 79(11), 7042-9.
- Gianni, T., Piccoli, A., Bertucci, C., Campadelli-Fiume, G. 2006b. Heptad repeat 2 in herpes simplex virus 1 gH interacts with heptad repeat 1 and is critical for virus entry and fusion. *J Virol.* 80(5), 2216-24.
- Gibbons, D. L., Vaney, M. C., Roussel, A., Vigouroux, A., Reilly, B., Lepault, J., Kielian, M., Rey, F. A. 2004. Conformational change and protein-protein interactions of the fusion protein of Semliki Forest virus. *Nature.* 427(6972), 320-5.
- Golden, M. P., Kim, S., Hammer, S. M., Ladd, E. A., Schaffer, P. A., DeLuca, N., Albrecht, M. A. 1992. Activation of human immunodeficiency virus by herpes simplex virus. *J Infect Dis.* 166(3), 494-9.

- Han, X., Bushweller, J. H., Cafiso, D. S., Tamm, L. K. 2001. Membrane structure and fusion-triggering conformational change of the fusion domain from influenza hemagglutinin. *Nat Struct Biol.* 8(8), 715-20.
- Hannah, B. P., Heldwein, E. E., Bender, F. C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. 2007. Mutational evidence of internal fusion loops in herpes simplex virus glycoprotein B. *J Virol.* 81(9), 4858-65.
- Harrison, S. C. 2008. The pH sensor for flavivirus membrane fusion. *J Cell Biol.* 183(2), 177-9.
- Heldwein, E. E., Lou, H., Bender, F. C., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J., Harrison, S. C. 2006. Crystal structure of glycoprotein B from herpes simplex virus 1. *Science.* 313(5784), 217-20.
- Herold, B. C., Visalli, R. J., Susmarski, N., Brandt, C. R., Spear, P. G. 1994. Glycoprotein C-independent binding of herpes simplex virus to cells requires cell surface heparan sulphate and glycoprotein B. *J Gen Virol.* 75 (Pt 6), 1211-22.
- Herrera-Martinez, E., Ondarza-Aguilera, R., Estrada-Parra, S., Perez, G., Barron, B. L. 2005. Comparison of two methods of PCR followed by enzymatic restriction digestion for detection and typing of herpes simplex viruses isolated from patients with mucocutaneous or cutaneous lesions. *Rev Latinoam Microbiol.* 47(3-4), 76-81.
- Ho, T. Y., Wu, S. L., Chen, J. C., Wei, Y. C., Cheng, S. E., Chang, Y. H., Liu, H. J., Hsiang, C. Y. 2006. Design and biological activities of novel inhibitory peptides for SARS-CoV spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antiviral Res.* 69(2), 70-6.
- Hutchinson, L., Browne, H., Wargent, V., Davis-Poynter, N., Primorac, S., Goldsmith, K., Minson, A. C., Johnson, D. C. 1992. A novel herpes simplex virus glycoprotein, gL, forms a complex with glycoprotein H (gH) and affects

- normal folding and surface expression of gH. *J Virol.* 66(4), 2240-50.
- Iyengar, R. 2009. Computational biochemistry: systems biology minireview series. *J Biol Chem.* 284(9), 5425-6.
- Jahn, R., Lang, T., Sudhof, T. C. 2003. Membrane fusion. *Cell.* 112(4), 519-33.
- Jinno, A., Haraguchi, Y., Shiraki, H., Hoshino, H. 1999. Inhibition of cell-free human T-cell leukemia virus type 1 infection at a postbinding step by the synthetic peptide derived from an ectodomain of the gp21 transmembrane glycoprotein. *J Virol.* 73(11), 9683-9.
- Jones, D. T. 1999. Protein secondary structure prediction based on position-specific scoring matrices. *J Mol Biol.* 292(2), 195-202.
- Jones, J. C., Turpin, E. A., Bultmann, H., Brandt, C. R., Schultz-Cherry, S. 2006. Inhibition of influenza virus infection by a novel antiviral peptide that targets viral attachment to cells. *J Virol.* 80(24), 11960-7.
- Jones, N. A., Geraghty, R. J. 2004. Fusion activity of lipid-anchored envelope glycoproteins of herpes simplex virus type 1. *Virology.* 324(1), 213-28.
- Keskin, O., Ma, B., Nussinov, R. 2005. Hot regions in protein--protein interactions: the organization and contribution of structurally conserved hot spot residues. *J Mol Biol.* 345(5), 1281-94.
- Kielian, M. 2006. Class II virus membrane fusion proteins. *Virology.* 344(1), 38-47.
- Kielian, M., Rey, F. A. 2006. Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nat Rev Microbiol.* 4(1), 67-76.
- Kimberlin, D. W., Rouse, D. J. 2004. Clinical practice. Genital herpes. *N Engl J Med.* 350(19), 1970-7.

- Kost, R. G., Hill, E. L., Tigges, M., Straus, S. E. 1993. Brief report: recurrent acyclovir-resistant genital herpes in an immunocompetent patient. *N Engl J Med.* 329(24), 1777-82.
- Krummenacher, C., Baribaud, I., Ponce de Leon, M., Whitbeck, J. C., Lou, H., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. 2000. Localization of a binding site for herpes simplex virus glycoprotein D on herpesvirus entry mediator C by using antireceptor monoclonal antibodies. *J Virol.* 74(23), 10863-72.
- Krummenacher, C., Rux, A. H., Whitbeck, J. C., Ponce-de-Leon, M., Lou, H., Baribaud, I., Hou, W., Zou, C., Geraghty, R. J., Spear, P. G., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H. 1999. The first immunoglobulin-like domain of HveC is sufficient to bind herpes simplex virus gD with full affinity, while the third domain is involved in oligomerization of HveC. *J Virol.* 73(10), 8127-37.
- Krummenacher, C., Supekar, V. M., Whitbeck, J. C., Lazear, E., Connolly, S. A., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H., Wiley, D. C., Carfi, A. 2005. Structure of unliganded HSV gD reveals a mechanism for receptor-mediated activation of virus entry. *Embo J.* 24(23), 4144-53.
- Kyte, J., Doolittle, R. F. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol.* 157(1), 105-32.
- Lawanprasert, S., Chaichantipyuth, C., Unchern, S., D., S. C. 2001. In vitro hepatotoxicity study of Barakol using human hepatoma cell line HepG2. *Thai J Pharm Sci* 25, 149-159.
- Lin, K., Simossis, V. A., Taylor, W. R., Heringa, J. 2005. A simple and fast secondary structure prediction method using hidden neural networks. *Bioinformatics.* 21(2), 152-9.
- Ma, B., Elkayam, T., Wolfson, H., Nussinov, R. 2003. Protein-protein interactions: structurally conserved residues distinguish between binding sites and exposed protein surfaces. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(10), 5772-7.

- Marotta, F., Harada, M., Goh, K. L., Lorenzetti, A., Marandola, P., Minelli, E. 2007. In vitro study on the mechanisms of action of a novel phytotherapeutic compound against human hepatoma cells. *Ann Hepatol.* 6(2), 111-6.
- Marsh, M. P., Campos, S. K., Baker, M. L., Chen, C. Y., Chiu, W., Barry, M. A. 2006. Cryoelectron microscopy of protein IX-modified adenoviruses suggests a new position for the C terminus of protein IX. *J Virol.* 80(23), 11881-6.
- Martens, S., McMahon, H. T. 2008. Mechanisms of membrane fusion: disparate players and common principles. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9(7), 543-56.
- Maurer, U. E., Sodeik, B., Grunewald, K. 2008. Native 3D intermediates of membrane fusion in herpes simplex virus 1 entry. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 105(30), 10559-64.
- Melikyan, G. B., Markosyan, R. M., Hemmati, H., Delmedico, M. K., Lambert, D. M., Cohen, F. S. 2000. Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J Cell Biol.* 151(2), 413-23.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D., Harrison, S. C. 2004. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature.* 427(6972), 313-9.
- Mole, L., Ripich, S., Margolis, D., Holodniy, M. 1997. The impact of active herpes simplex virus infection on human immunodeficiency virus load. *J Infect Dis.* 176(3), 766-70.
- Notredame, C., Higgins, D. G., Heringa, J. 2000. T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J Mol Biol.* 302(1), 205-17.
- O'Brien, W. J., Taylor, J. L. 1989. The isolation of herpes simplex virus from rabbit corneas during latency. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 30(3), 357-64.

- Parker, J. M., Guo, D., Hodges, R. S. 1986. New hydrophilicity scale derived from high-performance liquid chromatography peptide retention data: correlation of predicted surface residues with antigenicity and X-ray-derived accessible sites. *Biochemistry*. 25(19), 5425-32.
- Peng, T., Ponce de Leon, M., Novotny, M. J., Jiang, H., Lambris, J. D., Dubin, G., Spear, P. G., Cohen, G. H., Eisenberg, R. J. 1998. Structural and antigenic analysis of a truncated form of the herpes simplex virus glycoprotein gH-gL complex. *J Virol*. 72(7), 6092-103.
- Pertel, P. E., Fridberg, A., Parish, M. L., Spear, P. G. 2001. Cell fusion induced by herpes simplex virus glycoproteins gB, gD, and gH-gL requires a gD receptor but not necessarily heparan sulfate. *Virology*. 279(1), 313-24.
- Piñon, J. D., Kelly, S. M., Price, N. C., Flanagan, J. U., Brighty, D. W. 2003. An antiviral peptide targets a coiled-coil domain of the human T-cell leukemia virus envelope glycoprotein. *J Virol*. 77(5), 3281-90.
- Pope, L. E., Marcelletti, J. F., Katz, L. R., Lin, J. Y., Katz, D. H., Parish, M. L., Spear, P. G. 1998. The anti-herpes simplex virus activity of n-docosanol includes inhibition of the viral entry process. *Antiviral Res*. 40(1-2), 85-94.
- Reske, A., Pollara, G., Krummenacher, C., Chain, B. M., Katz, D. R. 2007. Understanding HSV-1 entry glycoproteins. *Rev Med Virol*. 17(3), 205-15.
- Rice, P., Longden, I., Bleasby, A. 2000. EMBOSS: the European Molecular Biology Open Software Suite. *Trends Genet*. 16(6), 276-7.
- Roche, S., Bressanelli, S., Rey, F. A., Gaudin, Y. 2006. Crystal structure of the low-pH form of the vesicular stomatitis virus glycoprotein G. *Science*. 313(5784), 187-91.
- Rohl, C. A., Strauss, C. E., Misura, K. M., Baker, D. 2004. Protein structure

- prediction using Rosetta. *Methods Enzymol.* 383, 66-93.
- Roizman, B., P., P. 2007. The family Herpesviridae: a brief introduction. In "Fields Virology" (D. Knipe, P. Howley, D. Griffin, R. Lamb, M. Martin, Eds.), Vol. 1, Fifth ed. Lippincott Williams & Willins. pp. 2381-2399.
- Roussel, A., Lescar, J., Vaney, M. C., Wengler, G., Wengler, G., Rey, F. A. 2006. Structure and interactions at the viral surface of the envelope protein E1 of Semliki Forest virus. *Structure.* 14(1), 75-86.
- Sacks, S. L., Wanklin, R. J., Reece, D. E., Hicks, K. A., Tyler, K. L., Coen, D. M. 1989. Progressive esophagitis from acyclovir-resistant herpes simplex. Clinical roles for DNA polymerase mutants and viral heterogeneity? *Ann Intern Med.* 111(11), 893-9.
- Sagara, Y., Inoue, Y., Shiraki, H., Jinno, A., Hoshino, H., Maeda, Y. 1996. Identification and mapping of functional domains on human T-cell lymphotropic virus type 1 envelope proteins by using synthetic peptides. *J Virol.* 70(3), 1564-9.
- Saito R., Sakai T., Sato I., Sano Y., Oshitani H., Sato M., Suzuki H. (2003) "Frequency of Amantadine-Resistant Influenza A Viruses during Two Seasons Featuring Cocirculation of H1N1 and H3N2" *J. Clin. Microbiol.* 41 (5): 2164-2165.
- Sapir, A., Avinoam, O., Podbilewicz, B., Chernomordik, L. V. 2008. Viral and developmental cell fusion mechanisms: conservation and divergence. *Dev Cell.* 14(1), 11-21.
- Schlessinger, A., Rost, B. 2005. Protein flexibility and rigidity predicted from sequence. *Proteins.* 61(1), 115-26.
- Schlessinger, A., Yachdav, G., Rost, B. 2006. PROFbval: predict flexible and rigid residues in proteins. *Bioinformatics.* 22(7), 891-3.

- Shukla, D., Spear, P. G. 2001. Herpesviruses and heparan sulfate: an intimate relationship in aid of viral entry. *J Clin Invest.* 108(4), 503-10.
- Simossis, B. A. 1999. Computational Method Relating Protein Sequences and Structure. In "Protein: A comprehensive Treatise" (G. Allen, Eds.), Vol. 1. JAI Press Inc. pp. 1528-1550.
- Simossis, V. A., Heringa, J. 2005. PRALINE: a multiple sequence alignment toolbox that integrates homology-extended and secondary structure information. *Nucleic Acids Res.* 33(Web Server issue), W289-94.
- Skehel, J. J., Wiley, D. C. 2000. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* 69, 531-69.
- Spear, P. G. 2004. Herpes simplex virus: receptors and ligands for cell entry. *Cell Microbiol.* 6(5), 401-10.
- Spear, P. G., Eisenberg, R. J., Cohen, G. H. 2000. Three classes of cell surface receptors for alphaherpesvirus entry. *Virology.* 275(1), 1-8.
- Spear, P. G., Longnecker, R. 2003. Herpesvirus entry: an update. *J Virol.* 77(19), 10179-85.
- Spear, P. G., Manoj, S., Yoon, M., Jogger, C. R., Zago, A., Myscofski, D. 2006. Different receptors binding to distinct interfaces on herpes simplex virus gD can trigger events leading to cell fusion and viral entry. *Virology.* 344(1), 17-24.
- Stiasny, K., Kossl, C., Lepault, J., Rey, F. A., Heinz, F. X. 2007. Characterization of a structural intermediate of flavivirus membrane fusion. *PLoS Pathog.* 3(2), e20.
- Swain, M. A., Peet, R. W., Galloway, D. A. 1985. Characterization of the gene

encoding herpes simplex virus type 2 glycoprotein C and comparison with the type 1 counterpart. *J Virol.* 53(2), 561-9.

Torres, J. 2007. Análisis bioinformático del glicoproteína H (gH) de distintos miembros de la familia Herpesviridae. ENCB, IPN, México DF.

Trybala, E., Bergstrom, T., Svennerholm, B., Jeansson, S., Glorioso, J. C., Olofsson, S. 1994. Localization of a functional site on herpes simplex virus type 1 glycoprotein C involved in binding to cell surface heparan sulphate. *J Gen Virol.* 75 (Pt 4), 743-52.

VanCompernelle, S. E., Wiznycia, A. V., Rush, J. R., Dhanasekaran, M., Baures, P. W., Todd, S. C. 2003. Small molecule inhibition of hepatitis C virus E2 binding to CD81. *Virology.* 314(1), 371-80.

Vere Hodge, R. A., Y.C., C. 1993. The mode of action of penciclovir. *Antiviral Chem. Chemother.* 4(1), 13-24.

Wahlberg, J. M., Bron, R., Wilschut, J., Garoff, H. 1992. Membrane fusion of Semliki Forest virus involves homotrimers of the fusion protein. *J Virol.* 66(12), 7309-18.

Wahlberg, J. M., Garoff, H. 1992. Membrane fusion process of Semliki Forest virus. I: Low pH-induced rearrangement in spike protein quaternary structure precedes virus penetration into cells. *J Cell Biol.* 116(2), 339-48.

Weiss, H. 2004. Epidemiology of herpes simplex virus type 2 infection in the developing world. *Herpes.* 11 Suppl 1, 24A-35A.

Weissenhorn, W., Hinz, A., Gaudin, Y. 2007. Virus membrane fusion. *FEBS Lett.* 581(11), 2150-5.

WHO 2008. Herpesvirus type 2, Vol. 2009.

Zhang, Y., Zhang, W., Ogata, S., Clements, D., Strauss, J. H., Baker, T. S., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G. 2004. Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure*. 12(9), 1607-18.

Zhou, G., Roizman, B. 2007. Separation of receptor-binding and profusogenic domains of glycoprotein D of herpes simplex virus 1 into distinct interacting proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104(10), 4142-6.