

Universidad de Barcelona  
Facultad de Farmacia  
Departamento de Fisicoquímica

Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Instituto de Investigaciones Químicas y Ambientales de Barcelona  
Departamento de Química de Péptidos y Proteínas

Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer  
Hospital Clínico de Barcelona  
Servicio de Inmunología

Programa de doctorado "Medicaments, alimentació i salut"  
Bienio: 2000-2002

# **Diseño y síntesis de péptidos para el diagnóstico de la infección por el virus de la hepatitis G (GBV-C/HGV)**

Memoria presentada por M<sup>a</sup> Teresa Pérez Escoda para optar al grado de doctor por la Universidad de Barcelona

Directores:

Dra. Isabel Haro Villar  
Investigador Científico  
Dept. Química de Péptidos y Proteínas  
IIQAB - CSIC

Dra. Guadalupe Ercilla González  
Consultor  
Servicio de Inmunología  
IDIBAPS - Hospital Clínico

Tutor:

Dra. Montserrat Muñoz  
Profesora asociada  
Departamento de Fisicoquímica  
Facultad de Farmacia  
Universidad de Barcelona

M<sup>a</sup> Teresa Pérez Escoda  
Barcelona, marzo 2007

## **CAPÍTULO 2**

**Diseño de un ensayo inmunoenzimático basado en péptidos sintéticos con aplicación al diagnóstico de la infección por GBV-C/HGV**



## 2.1 El ensayo inmunoenzimático: ELISA

Las moléculas de anticuerpo son altamente específicas para su correspondiente antígeno, siendo capaces de detectar una molécula de un antígeno proteico entre  $10^8$  moléculas similares. Esto convierte a los anticuerpos en un inestimable reactivo en los procesos biológicos. La utilidad de los anticuerpos como reactivos moleculares ha estimulado el desarrollo de muchas técnicas altamente específicas y sensibles para medir su presencia, su especificidad y afinidad para un rango de antígenos, así como para determinar sus capacidades funcionales. Muchas de las técnicas estandarizadas se basan en la especificidad y estabilidad de la unión antígeno-anticuerpo.

La posibilidad de utilizar enzimas como marcadores de anticuerpos o antígenos ha dado lugar a la aparición de los métodos inmunoenzimáticos, que permiten reemplazar a métodos que utilizan otros marcadores, tales como la inmunofluorescencia o el radioinmunoensayo.

El fundamento es el mismo para todas las variantes: uno de los componentes de la reacción, unido a un enzima, reacciona con el otro (unido a tejidos o a un soporte) detectándose después la actividad enzimática con la ayuda de sustratos específicos. Si el sustrato genera productos solubles, éstos pueden medirse espectrofotométricamente (determinación cuantitativa), mientras que si los productos se depositan en forma de precipitados coloreados insolubles y estables, en el sitio de actividad del enzima, nos dan una visualización directa del proceso.

Existen dos aspectos cruciales en los ensayos serológicos. En primer lugar y con la finalidad de obtener información cuantitativa, es necesario que al menos uno de los reactivos se encuentre en forma pura y detectable (en nuestro caso los péptidos). En segundo lugar, y para determinar la unión específica antígeno-anticuerpo, debe existir un medio de separación entre la fracción unida del reactivo y la fracción no unida. Esta separación se consigue teniendo el reactivo no marcado adsorbido a una superficie sólida y permitiendo que el reactivo marcado que se une pueda ser separado de la fracción no unida mediante lavados.

La técnica de ELISA (del inglés *enzyme-linked immunosorbent assay*), consiste, básicamente, en capturar la molécula a analizar entre otras dos macromoléculas, una de las cuales se encuentra conjugada a un enzima, lo cual permite su detección mediante un cromógeno o sustancia luminiscente. Esta es la base de la mayoría de tests inmunodiagnósticos para la detección, por ejemplo del síndrome de la inmunodeficiencia adquirida, hepatitis, alergias y muchas otras enfermedades humanas o animales [113,69].

Existen diferentes modalidades de ELISA según la naturaleza inmunológica de la sustancia problema y según el reactivo marcado enzimáticamente: ELISA directo, ELISA indirecto, ELISA de captura y ELISA de competición. La modalidad más extendida y utilizada es la que se denomina ELISA indirecto.

### **2.1.1 ELISA indirecto**

En esta técnica no competitiva para la detección de anticuerpos, basada en la descrita por Engvall y Perlmann [114] en la década de los 70, se adsorbe el antígeno específico en la microplaca de titulación. Tras separar mediante lavados la fracción no unida, se añade la muestra problema diluida. De nuevo se lava para eliminar la muestra no unida y se adiciona una anti-inmunoglobulina marcada específicamente, dirigida contra la especie a la que pertenece la muestra. Posteriormente, se lava y el último paso consiste en añadir el sustrato enzimático que da una cantidad de color directamente proporcional a la concentración de anticuerpo presente en la muestra problema. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos, disoluciones donde se encuentra o se le ha añadido el antígeno buscado. Es el ensayo más popular, pues un mismo anticuerpo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permiten cuantificar una gran cantidad de antígenos.

## **2.2 Optimización del ensayo inmunoenzimático**

Para asegurar la validez de los resultados de ELISA realizados se debían tener optimizadas todas las etapas del ensayo. En el presente trabajo, en primer lugar, se estudió que tipo de fase sólida proporcionaba una mejor respuesta, dependiendo de la orientación de los péptidos en la placa. Se estudió también el efecto de la dilución de las muestras de suero, llevando a cabo estudios comparativos y seleccionando aquella dilución que permitiera una mejor discriminación entre muestras negativas y positivas. Por último, también se estudió la concentración de péptido óptima para unir a la placa.

### **2.2.1 Unión covalente de los péptidos a las microplacas**

Entre las fases sólidas que existen, la más utilizada es el plástico, concretamente el poliestireno. Las superficies más utilizadas son las placas de poliestireno con 96 pocillos. Las fuerzas de unión que se dan entre el antígeno y la fase sólida son hidrofóbicas. El poliestireno también puede encontrarse irradiado o tener funcionalizada la superficie lo que permite la unión covalente del antígeno a la fase sólida además de las uniones por adsorción física. Otras fases sólidas que se utilizan habitualmente en los inmunoensayos son membranas de nitrocelulosa o nilón, las cuales también permiten la unión covalente.

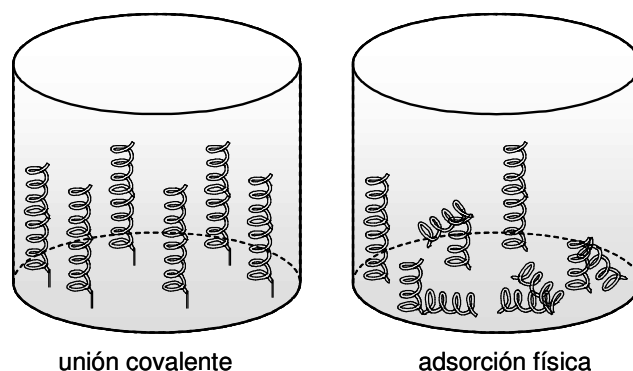
Cuando los péptidos sintéticos se colocan directamente sobre la superficie de una microplaca y reaccionan con los anticuerpos, puede ser difícil verificar si un resultado negativo se debe a la falta de unión entre el péptido y el anticuerpo, o la falta de unión inicial entre el péptido y la superficie de la microplaca. Una manera de determinar si la unión del péptido a la microplaca es homogénea, tras la etapa de tapizado se añade un colorante proteico, cuya lectura demostrará la unión del péptido a la superficie.

Las consecuencias de la adsorción pasiva de proteínas al poliestireno han sido estudiadas por varios grupos [115,116], llegando a la conclusión que la adsorción pasiva puede conllevar la pérdida o alteración de los antígenos, la pérdida de actividad enzimática o la generación de nuevos epítomos, debido a cambios conformacionales o fisicoquímicos que pueden darse en el antígeno tras la adsorción [117]. Es por estos motivos por los que la utilización de péptidos sintéticos lineales como sustratos en ELISA puede dar resultados menos sensibles de los esperados.

Se han realizado numerosos intentos para establecer nuevos métodos que consigan una inmovilización eficiente, rápida y segura de moléculas pequeñas en las placas de los inmunoensayos. Existen trabajos en los que se utilizan péptidos marcados radiactivamente, que conlleva el problema añadido de trabajar con elementos radioactivos. También se encuentran en la literatura trabajos en los que los péptidos se encuentran conjugados a proteínas portadoras como la albúmina bovina sérica (BSA) [118,119,120] o la hemocianina (KLH) [121], o la utilización de péptidos lineales derivatizados con ácidos grasos [122,92] que sí tienen buenas propiedades de adsorción al plástico. Otra aproximación para mejorar la unión de los péptidos al poliestireno consiste en la unión de los péptidos a biotina y aprovechar la gran afinidad de ésta por la estreptavidina con la que se recubre la superficie de las placas [123,124]. Todas estas aproximaciones, sin embargo, requieren un elevado consumo de tiempo para preparar los péptidos modificados.

Debido a la experiencia existente en nuestro grupo de investigación y basándonos en los resultados obtenidos en trabajos anteriores [122,92], ya se conocía la mejora en la detección de los anticuerpos que producía la unión de los péptidos a las microplacas mediante la formación de un enlace covalente. Søndergard-Anderson *et al.* observaron en sus estudios [125] que las angiotensinas I y II eran entre cinco y diez veces más antigénicas cuando se las unía covalentemente a la placa en lugar de adsorberlas.

Existen en el mercado distintas microplacas para ensayos de ELISA que permiten la unión covalente del antígeno en la fase sólida. De entre las principales ventajas que presenta la unión covalente respecto a la adsorción física se pueden destacar dos. En primer lugar, la formación de un enlace covalente permite la unión más orientada de la molécula a la vez que disminuye el número de reacciones inespecíficas. En segundo lugar, debido a que la unión es muy fuerte se pueden realizar lavados con disoluciones con una fuerza iónica elevada sin peligro de perder el antígeno unido.



**Figura 2.1.** Representación de la unión a la fase sólida por formación de un enlace covalente o por adsorción física directa.

En la Figura 2.1 se muestra una ilustración esquemática de la ventaja de la inmovilización covalente respecto a la adsorción física. La unión covalente puede tener lugar directamente a través de un grupo activo de la molécula y asegurar una unión más dirigida de los péptidos. En la adsorción física puede ocurrir que al unirse el péptido con el plástico tenga lugar un cambio en la conformación del péptido y en consecuencia que el anticuerpo no pueda reconocer su lugar de unión.

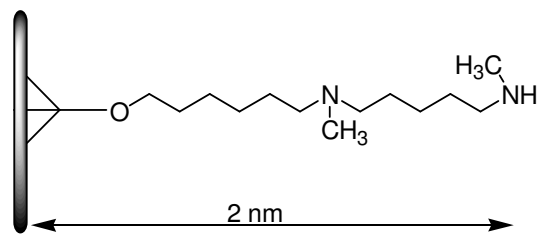
En esta tesis se centró el interés en estudiar la importancia del tipo de enlace establecido entre la superficie de la placa y el péptido así como la orientación que puede adoptar el péptido. Se han estudiado diferentes estrategias de unión covalente de los péptidos sintéticos de GBV-C/HGV a las microplacas de ELISA. Se analizó el efecto de la orientación del péptido en la superficie con la capacidad de reconocer anticuerpos anti-GBV-C/HGV. Para llevar a cabo estas diferentes estrategias de enlace se aprovecharon las funciones amino y carboxilo presentes en todos los péptidos sintetizados. Los grupos involucrados en la formación del enlace covalente son principalmente el grupo N-terminal o bien el grupo C-terminal del péptido en forma de ácido carboxílico, si bien también pueden intervenir el grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina o bien los ácidos carboxílicos de las cadenas laterales de los residuos de ácido aspártico y ácido glutámico.

### 2.2.1.1 Unión por formación de un enlace entre la superficie de la placa y las funciones amino de los péptidos

Para realizar la unión a través de los grupos amino se emplearon dos tipos distintos de placas comerciales. En primer lugar las microplacas Covalink™ NH de la casa comercial Nunc y en segundo lugar las placas DNA-Bind™ suministradas por la casa comercial Costar.

#### Unión en placas Covalink™ NH

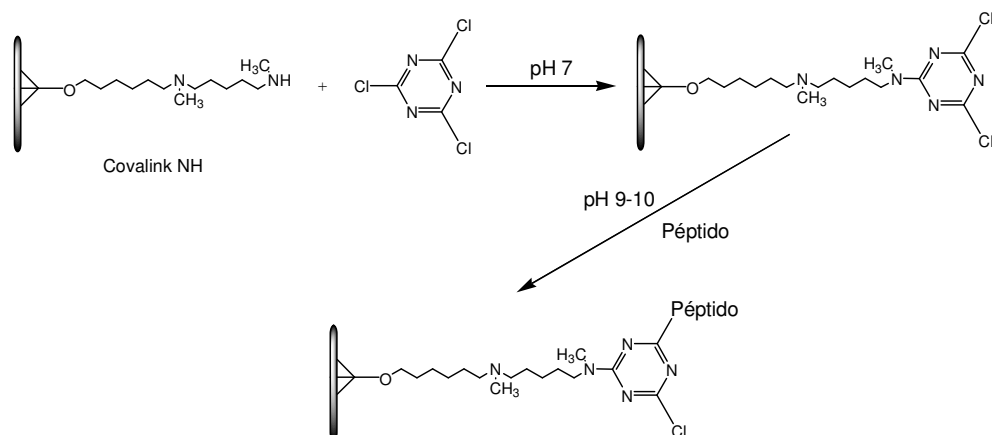
Las placas de microensayo Covalink™ NH se caracterizan por tener grupos amino secundarios unidos al poliestireno a través de un espaciador de 2 nm aproximadamente.



**Figura 2.2.** Representación esquemática de la configuración química de la superficie de las placas Covalink™NH.

En este caso fue necesario activar la superficie de la placa con cloruro de cianurilo, molécula que a la vez, se unirá con el péptido. La reactividad de los átomos de cloro disminuye a la vez que los átomos de cloro son sustituidos por una amina. El primer átomo de cloro reacciona con aminas en medio acuoso, mientras que los átomos de cloro restantes, son estables a pH neutro. Al aumentar el pH hasta valores de 9-10, tiene lugar una sustitución nucleófila de uno de los átomos de cloro que todavía quedan en la molécula por parte de otro grupo amino, en este caso, del péptido (Figura 2.3) [126]. De este modo, a través del cloruro de cianurilo, queda unido el péptido a la fase sólida a través de sus grupos amino.

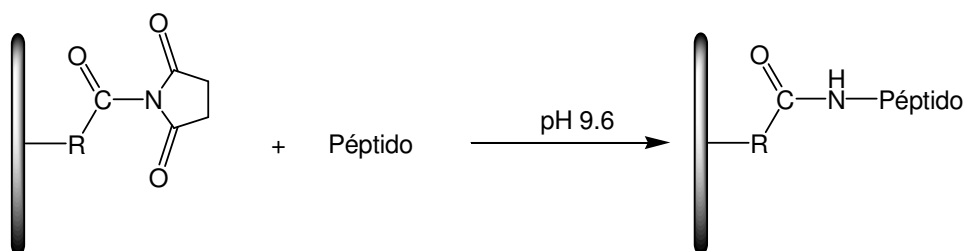




**Figura 2.3.** Esquema de la reacción de inmovilización covalente del péptido a través de los grupos amino en las placas Covalink™ NH.

#### Unión en placas DNA-Bind™

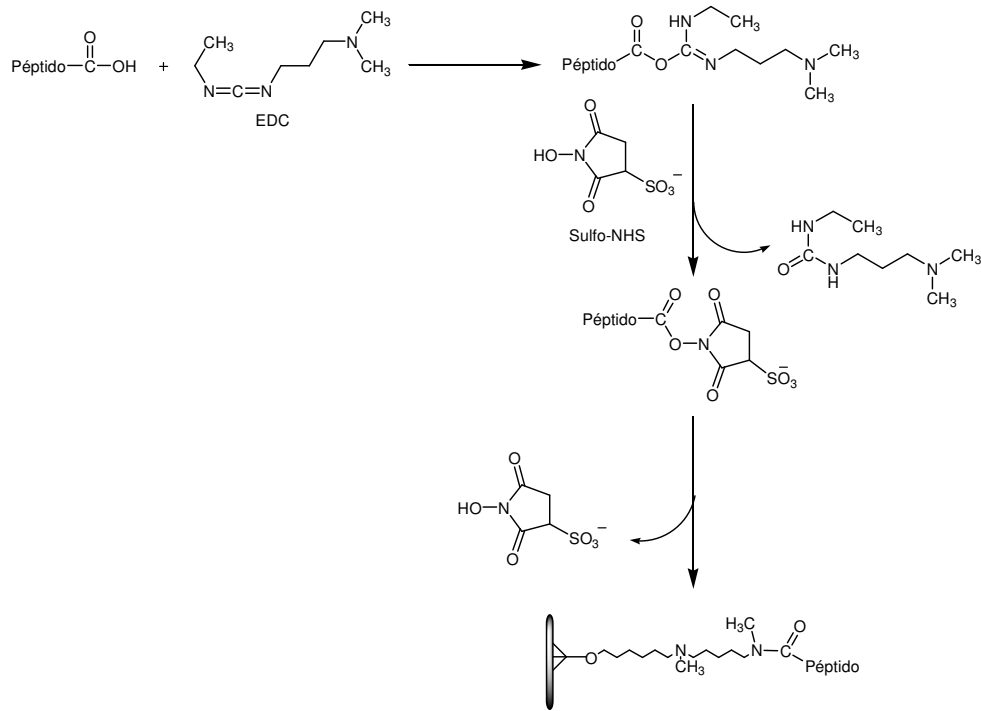
La superficie de estas placas está recubierta por una capa de ésteres de N-oxisuccinimida (NOS) reactivos frente a nucleófilos como son los grupos amino de los péptidos. Los grupos NOS se encuentran unidos covalentemente a la placa y no existe el riesgo de eliminarlos mediante los lavados sucesivos. Cuando las aminas reaccionan con los grupos NOS en un pH ligeramente básico, el éster sufre una sustitución nucleófila en el que la amina ataca al grupo carbonilo y desplaza el grupo NOS (Figura 2.4). Es importante remarcar que esta superficie presenta la ventaja que no requiere ninguna modificación química del péptido para ser inmovilizado.



**Figura 2.4.** Representación de la superficie de las placas Costar y de la reacción que tiene lugar para la formación del enlace covalente entre el péptido y la superficie del poliestireno.

### 2.2.1.2 Unión por formación de un enlace entre la superficie de la placa y las funciones ácido carboxílico de los péptidos

Esta aproximación únicamente fue posible realizarla con las placas de microensayo Covalink™ NH.

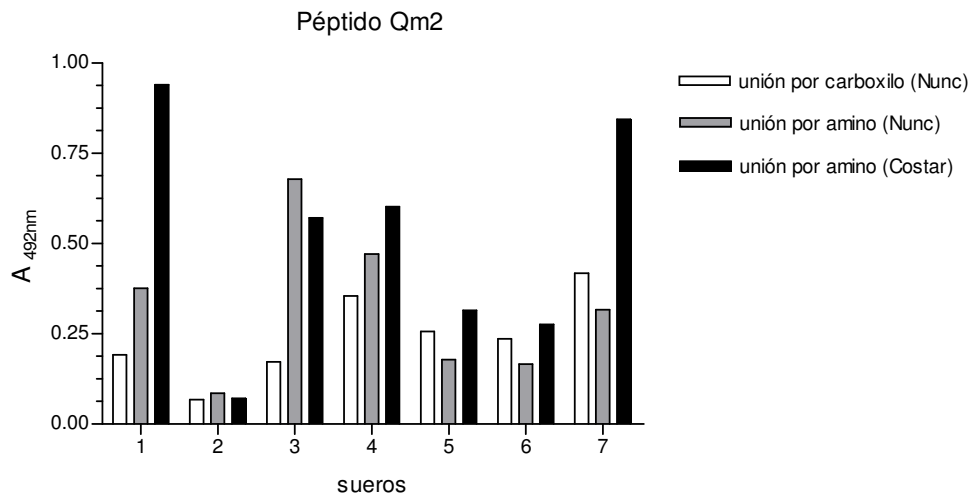


**Figura 2.5.** Esquema de la reacción para la inmovilización del péptido a través de sus grupos carboxilo en las placas Covalink™ NH.

En este caso, los grupos carboxílicos forman un enlace peptídico con la superficie sólida aminada. La formación del enlace amida entre el grupo carboxílico del péptido y la amina tiene lugar por acción de la 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC), que activa el carboxilato para formar una O-acilurea. Sin embargo, cuando la reacción se lleva a cabo en medio acuoso, el compuesto es susceptible de sufrir una hidrólisis. Para evitar esta hidrólisis, está demostrado que añadir sulfo-N-hidroxisuccinimida (sulfo-NHS) en el medio de reacción da lugar a que se forme un intermedio mucho más resistente a la hidrólisis. De este modo, el éster activado de O-acilurea reacciona con la sulfo-NHS formando un éster succinimidil activado mucho más estable [127].

Se estudió comparativamente un pequeño número de sueros con los péptidos NS4b(8-22), NS5a(112-126), Qm1 y Qm2 inmovilizados de las tres maneras comentadas. Los péptidos se unieron a una concentración de  $10 \mu\text{g ml}^{-1}$  en todos los casos. Una vez inmovilizados los péptidos, el protocolo de ELISA seguido fue el mismo para los tres ensayos y se encuentra descrito en el apartado 8.3 de materiales y métodos.

En la Figura 2.6 se muestra a modo de ejemplo los resultados obtenidos para el péptido quimérico Qm2. Se obtuvieron perfiles similares para los otros tres péptidos con los que se realizó este ensayo.



**Figura 2.6.** Comparación de las reactividades obtenidas con distintos sueros para el péptido quimérico Qm2 en función del protocolo seguido para unir el péptido a la placa de microensayo.

Se compararon mediante un test tipo *t-student* (Tabla 2.1), los valores de las reactividades de los sueros obtenidas para los cuatro péptidos en función del método seguido para la inmovilización del péptido y únicamente se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ( $P < 0.05$ ) para el péptido quimérico Qm2.

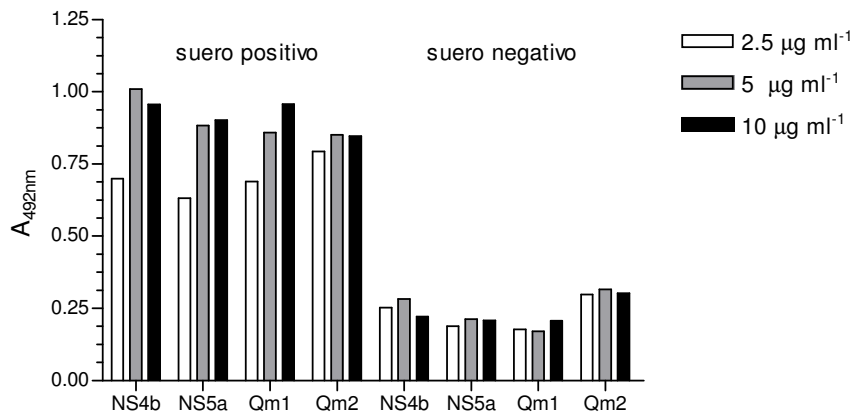
**Tabla 2.1.** Valores P calculados a partir de las reactividades obtenidas para cada péptido en función del tipo de unión a la placa. Se estableció un intervalo de confianza del 95%, por lo que valores de  $P < 0.05$  indican diferencias significativas entre los grupos comparados.

	NS4b(8-22)		NS5a(112-126)		Qm1		Qm2	
	valor P	P<0.05	valor P	P<0.05	valor P	P<0.05	valor P	P<0.05
unión por carboxilo vs unión por amino (Nunc)	0,8797	No	0,8309	No	0,6086	No	0,3522	No
unión por amino (Nunc) vs unión por amino (Costar)	0,2067	No	0,9461	No	0,2558	No	0,0952	No
unión por carboxilo VS unión por amino (Costar)	0,3890	No	0,8509	No	0,0906	No	0,0362	Sí

Teniendo en cuenta estos resultados se decidió escoger el protocolo de inmovilización en el que los péptidos se unen a la microplaca mediante las funciones amina por formación de un enlace peptídico con el éster de N-oxisuccinimida presente en la superficie de la placa. Hay que destacar que este método de unión no requiere ningún tipo de activación ni de la fase sólida ni del péptido, lo que lo convierte, además, en el procedimiento más cómodo y sencillo. Todos los inmunoensayos que se comentan de aquí en adelante fueron realizados siguiendo el protocolo de unión a las placas DNA-Bind (Costar).

### 2.2.2 Efecto de la concentración de péptido unido a placa

Con la finalidad de optimizar la concentración adecuada de péptido para unir a la fase sólida se comparó la reactividad de distintos sueros frente a distintas concentraciones de péptido unido de forma covalente. En la Figura 2.7 se muestra la reactividad de un suero potencialmente positivo y un suero control negativo procedente de un voluntario sano frente a los distintos péptidos estudiados. Cada uno de los péptidos se estudió a concentraciones de 2.5, 5 y 10  $\mu\text{g ml}^{-1}$  diluidos en tampón carbonato/bicarbonato 0.05 M pH 9.6.

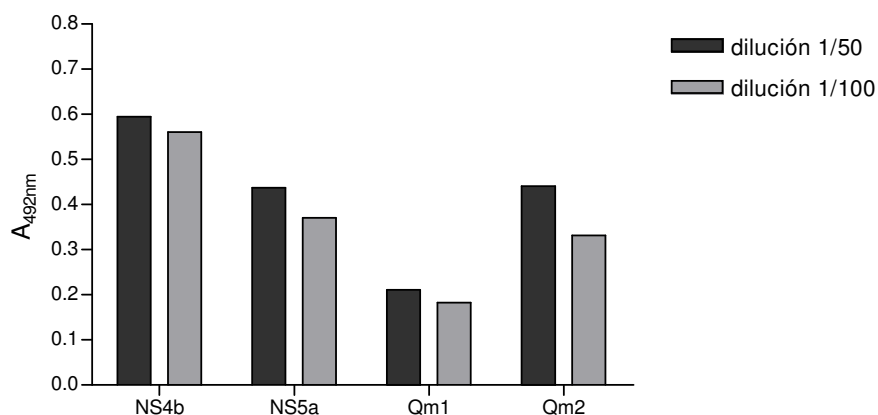


**Figura 2.7.** Comparación de la reactividad de un suero positivo y un suero negativo para las secuencias NS4b(8-22), NSa(112-126), Qm1 y Qm2 a las concentraciones de 2.5, 5 y 10 µg ml<sup>-1</sup>.

Las reactividades obtenidas por los sueros cuando la cantidad de péptido unido a la placa fue de 2.5 µg ml<sup>-1</sup> resultaron ser estadísticamente diferentes ( $P < 0.05$ ) para los sueros positivos al compararlos con las obtenidas cuando la concentración de péptido unido fue de 5 µg ml<sup>-1</sup>, traducido en una mayor detección de los anticuerpos por parte de los péptidos. Sin embargo, las reactividades de los sueros cuando la concentración de péptido unido a la placa fue de 10 µg ml<sup>-1</sup> no presentó una mejora significativa de las reactividades respecto a la de 5 µg ml<sup>-1</sup>, por este motivo se seleccionó la concentración de 5 µg ml<sup>-1</sup> para llevar a cabo el resto de los ensayos. Probablemente a esta concentración ya se han ocupado todos los puntos funcionales reactivos de la superficie, por lo que el incremento de la concentración de péptido no repercute en el incremento de moléculas unidas. Además, a esta concentración de 5 µg ml<sup>-1</sup> es posible diferenciar con claridad la presencia o ausencia de reactividad.

### 2.2.3 Efecto de la dilución de los sueros

Finalmente, el último parámetro a estandarizar fue la dilución del suero. Se estudió la reactividad con los péptidos de un pequeño número de sueros diluidos 50 y 100 veces en tampón PBS-T-leche. Los resultados obtenidos (Figura 2.8) se analizaron estadísticamente y se encontraron diferencias significativas entre las dos diluciones estudiadas ( $P = 0.0493$ ), motivo por el cual se decidió trabajar con las muestras diluidas 50 veces en tampón.



**Figura 2.8.** Comparación de las reactividades de un suero a dilución 1/50 y 1/100 frente a los péptidos NS4b(8-22), NS5a(112-126), Qm1 y Qm2.

### 2.3 Estudio de la capacidad antigénica de las construcciones sintéticas

Una vez estudiados y optimizados los distintos factores que podían influir en los resultados del inmunoensayo, se estudió la capacidad para detectar anticuerpos anti-GBV-C/HGV de todas las secuencias y construcciones sintetizadas para esta tesis y cuya síntesis se encuentra descrita en el Capítulo 1 de esta memoria.

El protocolo establecido para el inmunoensayo teniendo en cuenta todos los parámetros estudiados anteriormente fue el siguiente: los péptidos se inmovilizaron en las placas por formación de un enlace peptídico entre los grupos amina del péptido con la superficie de la placa. Los péptidos fueron diluidos en tampón carbonato/bicarbonato 0.05 M pH 9.6 hasta una concentración de  $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ , en cada pocillo se añadieron 100  $\mu\text{l}$  de esta disolución y se incubaron las placas durante toda la noche a 4°C. Los sueros se diluyeron 50 veces en tampón PBS-T-leche previamente a su análisis. Las fases de lavado, reacción con el inmunorreactivo conjugado y la reacción con el sustrato enzimático se realizaron tal y como se encuentran descritas en el apartado 8.3 de materiales y métodos.

Es importante seleccionar correctamente el tipo de muestra con el que realizar los ensayos de detección de anticuerpos anti-GBV-C/HGV ya que debe tratarse de muestras pertenecientes a personas incluidas en los grupos de riesgo de sufrir la infección. Como se ha comentado en la introducción (apartado I.C), la vía de transmisión del virus es fundamentalmente parenteral, aunque existen otras rutas de transmisión descritas como pueden ser la sexual y la vertical.

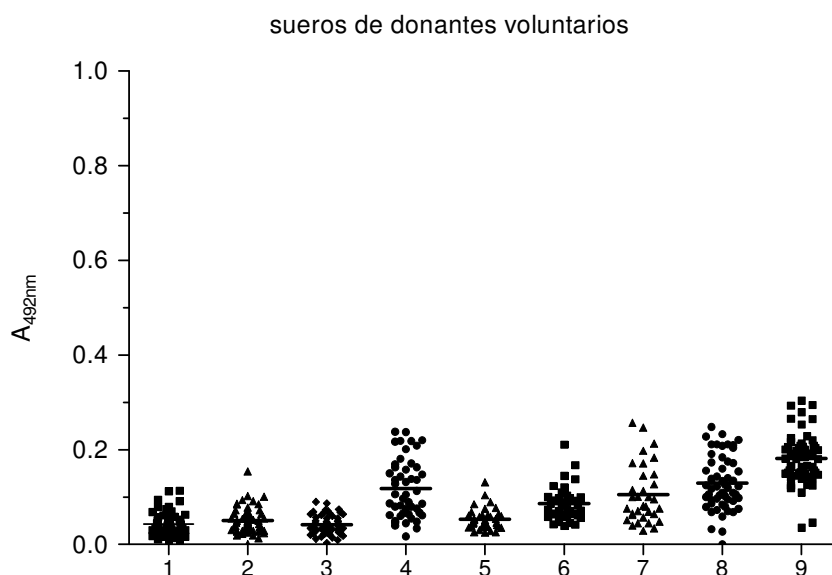
Las personas con frecuente exposición a sangre o a productos sanguíneos (hemofílicos u otras coagulopatías) poseen un elevado riesgo de adquirir el virus GBV-C/HGV. En el grupo de pacientes sometidos a hemodiálisis la prevalencia de la infección activa por GBV-C/HGV tiene un amplio espectro de frecuencias que oscilan entre el 5 y el 35% en diferentes estudios. Otro grupo con un elevado riesgo de sufrir la infección por el virus son los pacientes que ya sufren algún tipo de hepatitis, sobre todo las que se transmiten por vía parenteral, como son el HBV y el HCV. Entre el 15 y el 20% de los individuos con infección por HCV tienen además infección activa por GBV-C/HGV, y otro elevado porcentaje (25-70%) tiene evidencias de un contacto anterior con el virus (presencia de anticuerpos anti-E2) [33,34,35,128]. En España, también se han efectuado diversos estudios para conocer la prevalencia de la infección por GBV-C/HGV. Según estos estudios, entre el 6 y el 26% de los pacientes que requieren hemodiálisis presentaron infección activa por GBV-C/HGV, mientras que el 27% y el 19% de los pacientes estudiados presentaron coinfección con el virus HCV y HBV, respectivamente [129,130,131].

Teniendo en cuenta todos estos estudios, se consideraron de interés para el estudio de la presencia de anticuerpos anti-GBV-C/HGV las muestras procedentes de pacientes con hepatitis crónica y de pacientes sometidos a hemodiálisis.

#### Criterio de positividad de las muestras

Con la finalidad de un criterio a partir del cual poder considerar la reactividad de los sueros, positiva o no, se estudió el comportamiento de 80 sueros procedentes de donantes voluntarios con todas las construcciones sintéticas que forman parte del estudio. Estos sueros, procedentes de la población general, se consideraron controles negativos debido a la baja probabilidad de presentar anticuerpos anti-GBV-C/HGV. En la Figura 2.9 se muestran los valores de absorbancia obtenidos con dichas muestras para cada una de las moléculas sintéticas.

El valor de corte o *cut-off* (CO) se calculó para cada una de las moléculas como el promedio de las absorbancias obtenidas más dos desviaciones estándar. Así pues, todas las muestras que presentaron valores de absorbancia superior a este valor de corte se consideraron positivas. Dado que el CO varía para cada péptido, para poder comparar de una manera sencilla los resultados obtenidos, se dividió el valor de absorbancia de cada muestra entre el valor de CO de cada péptido. De aquí en adelante, todos los resultados de ELISA se expresan en forma de cociente  $A_{492nm}/CO$ . Las muestras se consideraron positivas para valores de  $A_{492nm}/CO$  igual o mayor que 1.

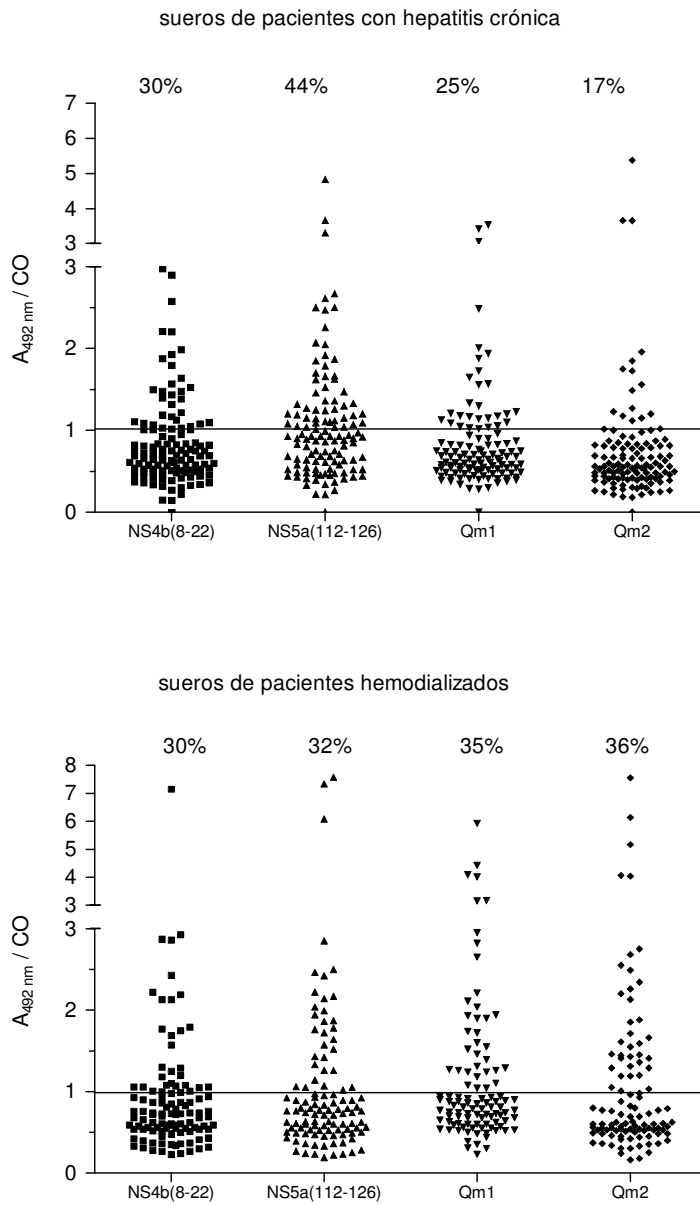


**Figura 2.9.** Valores de absorbancia obtenidos por ELISA de los sueros de donantes voluntarios (controles negativos) con los péptidos sintetizados. 1: NS4b(8-22), 2: NS5a8112-126), 3: Qm1, 4: Qm2, 5: NS4a(27-43), 6: cyc-HT, 7: cyc-CT, 8: E2(99-118), 9: MAP<sub>4</sub> E2-NS5a.

### 2.3.1 Comparación de las reactividades en ELISA de los péptidos NS4b(8-22) y NS5a(112-126) del virus GBV-C/HGV y sus construcciones quiméricas lineales Qm1 y Qm2.

Se estudió comparativamente la reactividad de las secuencias peptídicas lineales pertenecientes a las proteínas no estructurales del virus GBV-C/HGV NS4b(8-22) y NS5a(112-126) y de sus construcciones quiméricas, Qm1 y Qm2, con 100 sueros de pacientes con hepatitis crónica y 100 sueros de pacientes hemodializados. Las reactividades obtenidas por estas construcciones se muestran en la Figura 2.10.



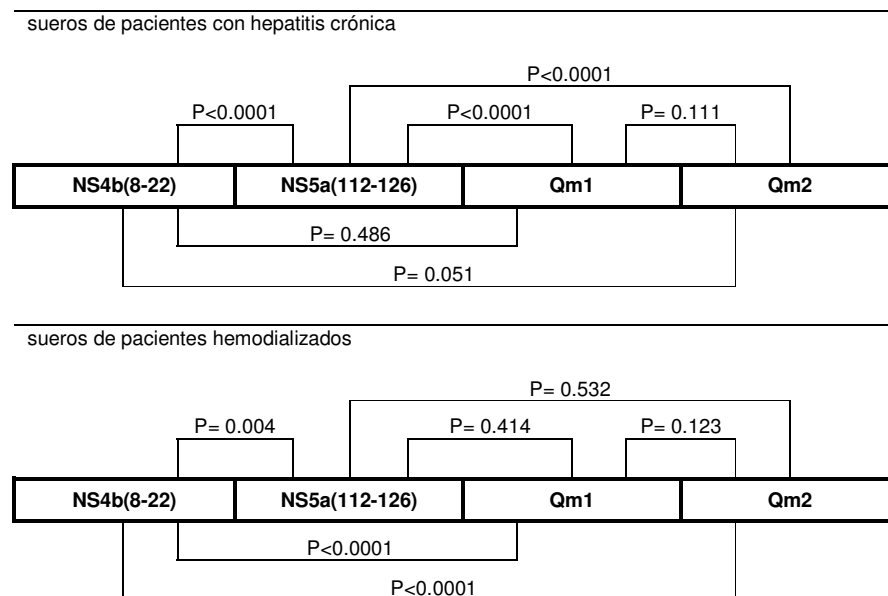


**Figura 2.10.** Reactividad en ELISA de los péptidos NS4b(8-22), NS5a(112-126), Qm1 y Qm2, con los dos paneles de sueros estudiados. Los sueros se consideraron positivos para valores de  $A_{492nm}/CO \geq 1$ . Los valores en la parte superior de cada columna indican el porcentaje de positividad para cada péptido.

En el caso de los sueros de pacientes hemodializados, se observó una reactividad alta para las cuatro secuencias comparadas, mostrando un gran número de sueros positivos. La reactividad observada para las construcciones quiméricas lineales alcanzó valores de hasta un 36% de positividad, significativamente superior ( $P < 0.05$ , ver Tabla 2.2) a la obtenida por la secuencia

monomérica NS4b(8-22), que mostró valores de reactividad no superiores al 30%. Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas para la secuencia NS5a(112-126), la cual alcanzó valores de reactividad del 32% ( $P=0.414$ ,  $P=0.532$ ), similares a los obtenidos por las secuencias quiméricas. Por otro lado, no se encontraron diferencias en las reactividades entre los dos péptidos quiméricos ( $P=0.123$ ), lo que pone de manifiesto que la orientación de los epítomos dentro de la molécula no afecta la capacidad antigénica de dichas secuencias. Además, es importante destacar que los valores obtenidos para el cociente  $A_{492nm}/CO$  son más altos para las construcciones quiméricas, que permiten una mayor diferenciación entre sueros positivos y sueros negativos, mejorando de este modo la detección de los anticuerpos anti-GVB-C/HGV en suero. En este contexto, para los péptidos diepitópicos Qm1 y Qm2, el número de muestras de suero con un cociente  $A_{492nm}/CO$  superior a 1.2 fue dos veces superior al obtenido por la secuencia monoepitópica NS4b(8-22), mientras que los resultados obtenidos por la secuencia NS5a(112-126) fueron similares a los obtenidos por los péptidos quiméricos.

**Tabla 2.2.** Valores P calculados a partir de las reactividades obtenidas para los dos paneles de sueros estudiados al comparar las secuencias NS4b(8-22), NS5a(112-126), Qm1 y Qm2. Se estableció un intervalo de confianza del 95%, por lo que valores de  $P < 0.05$  indican diferencias significativas entre los grupos comparados.



En el caso de los sueros procedentes de pacientes con hepatitis crónica, se observó una reactividad por parte de la secuencia NS5a(112-126) significativamente superior a las obtenidas por las secuencias NS4b(8-22), Qm1 y Qm2 ( $P < 0.05$ ). En este caso, además, más del 60% de las muestras obtuvieron un valor de  $A_{492nm}/CO$  superior a 1.2.

A pesar de que el papel que desempeñan las proteínas no estructurales NS4b y NS5a es poco conocido [17,75], éstas pueden contener regiones capaces de provocar una respuesta

antigénica detectable como ocurre con otros virus, como por ejemplo, la infección por el virus de la hepatitis C [132,133] y el dengue [134] donde los anticuerpos dirigidos contra proteínas no estructurales son fácilmente detectables .

Además, en los últimos años, se han descrito trabajos en los que se observaron incrementos tanto en la sensibilidad como en la especificidad de los ensayos cuando se utilizan péptidos quiméricos compuestos por más de un epítipo para analizar los sueros. La utilización de mezclas de péptidos sintéticos puede afectar tanto a la sensibilidad como a la especificidad del test debido a un efecto de competición entre los péptidos y la fase sólida, además de que podría comportar cambios en la distribución espacial de los epítopos.

Los resultados obtenidos con los sueros hemodializados muestran una mayor sensibilidad de las construcciones quiméricas respecto a las secuencias monoméricas. Sin embargo, estos resultados deseables no se observaron para los sueros de pacientes con hepatitis crónica, donde la reactividad de los péptidos Qm1 y Qm2 fue menor que la de sus respectivos monoméricos, del 25 y 17% para las construcciones quiméricas frente al 30% y 44% para las monoméricas. Estos resultados podrían explicarse por una reactividad cruzada de los péptidos NS4b(8-22) y NS5a(112-126) con anticuerpos dirigidos contra otras proteínas virales presentes en el suero de estos pacientes, como podrían ser proteínas de otros virus de hepatitis [135].

### **2.3.2 Comparación de las reactividades en ELISA del péptido NS4a(27-43) del virus GBV-C/HGV y sus construcciones cíclicas cyc-HT y cyc-CT.**

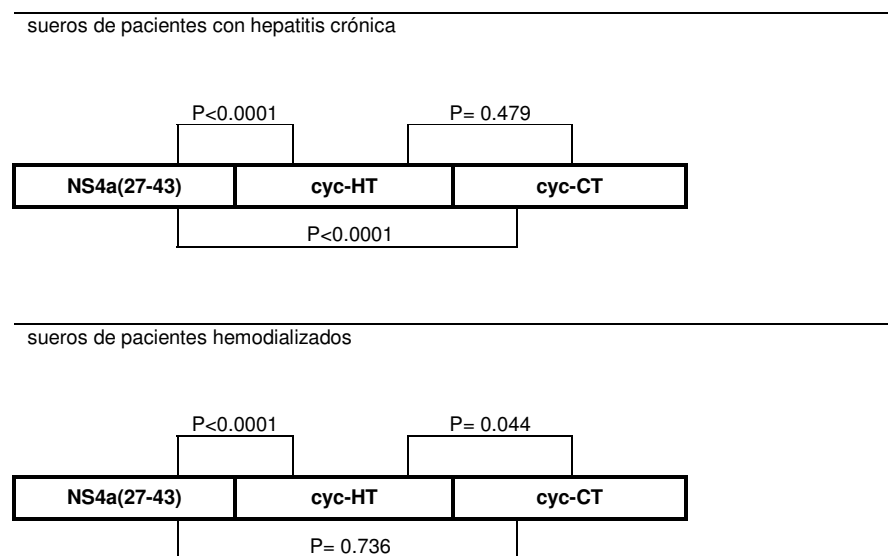
Del mismo modo que en el caso de los péptidos monoméricos y quiméricos, se comparó la reactividad obtenida por las construcciones cíclicas con la obtenida por la secuencia precursora lineal. Los resultados obtenidos se muestran gráficamente en la Figura 2.11. En este caso, los porcentajes de positividad alcanzados por las construcciones macrocíclicas, cyc-HT y cyc-CT, fueron superiores al alcanzado por su precursor lineal NS4a(27-43). La positividad alcanzada por los péptidos cíclicos con los sueros de pacientes hemodializados fue de hasta un 23% ( $P < 0.001$ ), para el macrociclo de 17 residuos (cyc-HT), y de un 18% ( $P < 0.736$ ) para el macrociclo de 12 residuos (cyc-CT), mientras que la construcción lineal no superó el 13% de reactividad positiva con este panel de sueros.

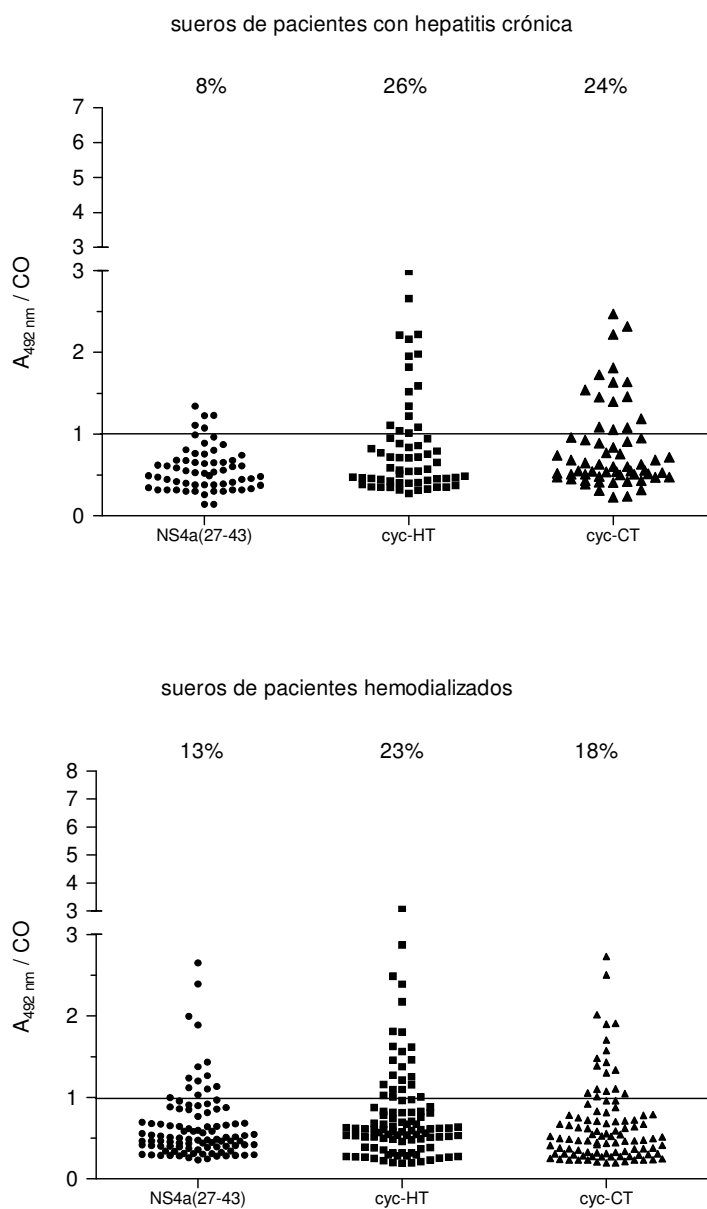
Tras estudiar la reactividad de estas tres construcciones con 60 sueros de pacientes con hepatitis crónica (Figura 2.11), se observó también en este caso, una mayor capacidad para detectar anticuerpos anti-GBV-C/HGV por parte de las construcciones cíclicas que la mostrada por su precursor lineal NS4a(27-43), 24 y 26% respecto el 8%. Además de una mayor capacidad para detectar anticuerpos anti-GBV-C/HGV, los péptidos cyc-HT y cyc-CT mostraron valores más elevados para el cociente  $A_{492nm}/CO$  respecto a la secuencia lineal, lo que los convierte en construcciones con

una mayor sensibilidad y permiten una mejor discriminación entre muestras positivas y muestras negativas.

En este caso, para los dos paneles de sueros analizados, se observaron reactividades superiores por parte de los péptidos cíclicos respecto a su homólogo lineal. Estos resultados demuestran, tal y como han apuntado otros autores [69] que los péptidos cíclicos pueden adoptar conformaciones que favorecen la unión de los anticuerpos, debido a que podrían mimetizar de una mejor manera la conformación que adoptan en la proteína nativa.

**Tabla 2.3.** Valores P calculados a partir de las reactividades obtenidas para los dos paneles de sueros estudiados al comparar la secuencia NS4a(27-43) y las construcciones cíclicas cyc-HT y cyc-CT. Se estableció un intervalo de confianza del 95%, por lo que valores de  $P < 0.05$  indican diferencias significativas entre los grupos comparados.





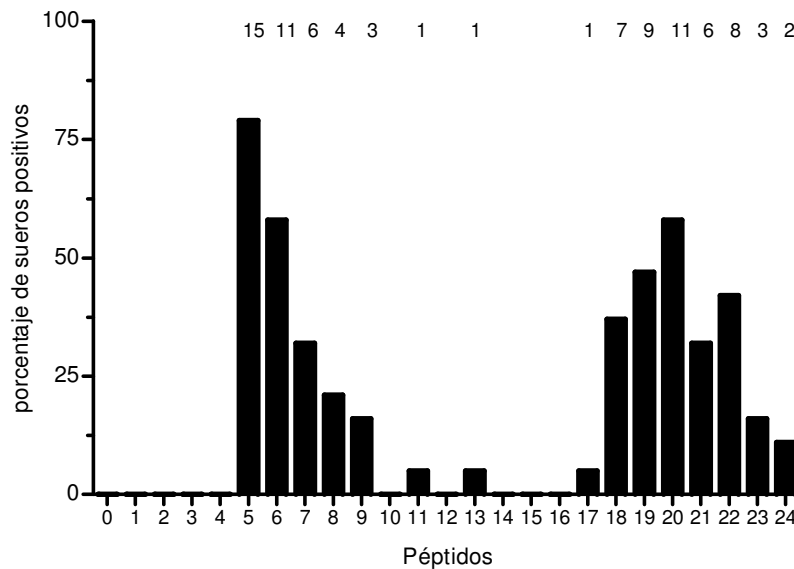
**Figura 2.11.** Reactividad en ELISA de los péptidos NS4a(27-43), cyc-HT y cyc-CT, con los dos paneles de sueros estudiados. Los sueros se consideraron positivos para valores de  $A_{492nm}/CO \geq 1$ . Los valores en la parte superior de cada columna indican el porcentaje de positividad para cada péptido.

**2.3.3 Estudio de la reactividad en ELISA de los péptidos superpuestos de la región 89-149 de la proteína de estructura E2 del virus GBV-CHGV.**

Un total de 20 sueros de los dos paneles disponibles (pacientes con hepatitis crónica y pacientes hemodializados) fueron testados por ELISA con la colección de los 24 péptidos superpuestos que abarcan la región 89-149 de la proteína de envoltura E2. El protocolo de ELISA seguido está descrito en el apartado 8.3 de los materiales y métodos.

El valor a partir del cual la reactividad con los péptidos se consideró positiva, se calculó para cada péptido como el promedio del 50% de las señales de absorbancia más bajas más tres desviaciones estándar, del mismo modo que se encuentra descrito en la literatura por otros autores [136]. En la Figura 2.12 se muestra el porcentaje de positividad obtenido para cada uno de los 24 péptidos.

Como se desprende de la figura, se observaron dos regiones con una gran capacidad para reconocer los anticuerpos anti-GBV-C/HGV. En primer lugar los sueros testados con los 24 péptidos reconocieron una región antigénica entre los aminoácidos 97 y 111 de la secuencia 89-149 de la proteína de envoltura E2, que corresponde a los péptidos P5, P6, P7, P8 y P9. 15 de los sueros mostraron reactividad con el péptido P5 (GSVSWFASTGGRDSK), y 11 de ellos además presentaron reactividad con el péptido P6 (VSWFASTGGRDSKID). De estos 11 sueros, 3 presentaron reactividad con los péptidos P7 y P8.



**Figura 2.12.** Porcentaje de reactividad de los sueros con los 24 péptidos superpuestos. Los números en la parte superior de las columnas indican el número de sueros que mostraron reactividad con dicho péptido.

La segunda región que mostró una buena capacidad antigénica fue la comprendida entre los aminoácidos 125 y 145 de la región 89-149 de la proteína de estructura E2. En este caso, 9 de los sueros fueron reconocidos por el péptido P19 (CTIAALGSSDRDVTVV), mientras que el péptido P20 (IAALGSSDRDVTVEL), reaccionó con 11 de los sueros. En esta región, aunque la reactividad fue más amplia en cuanto a número de péptidos capaces de reconocer alguno de los sueros como positivo, las señales de absorbancia obtenidas fueron más débiles. Por este motivo, se seleccionó la región comprendida entre los péptidos P5 y P9 y correspondiente al péptido E2(99-118): VSWFASTGGRDSKIDVWSLV la que se seleccionó como región estructural para incluirla en la estructura tetramérica del MAP.

#### **2.3.4 Comparación de las reactividades en ELISA de los péptidos E2(99-118) y NS5a(112-126) del virus GBV-C/HGV y su construcción peptídica ramificada tetramérica MAP<sub>4</sub> E2-NS5a.**

Diversos autores han descrito que en los inmunoensayos de fase sólida las estructuras multiméricas ramificadas o MAPs presentan una mayor capacidad de unión a los anticuerpos que los péptidos lineales [117,137,138,139,140]. Con esta finalidad se diseñó un péptido ramificado tetramérico constituido por dos copias del péptido lineal perteneciente a la proteína de envoltura E2, E2(99-118), y dos copias del péptido lineal NS5a(112-126) de la proteína no estructural NS5a. Con esta construcción, además de aumentar el número de epítomos contenidos dentro de una misma molécula, se combinan epítomos de proteínas de envoltura con epítomos de proteínas no estructurales.

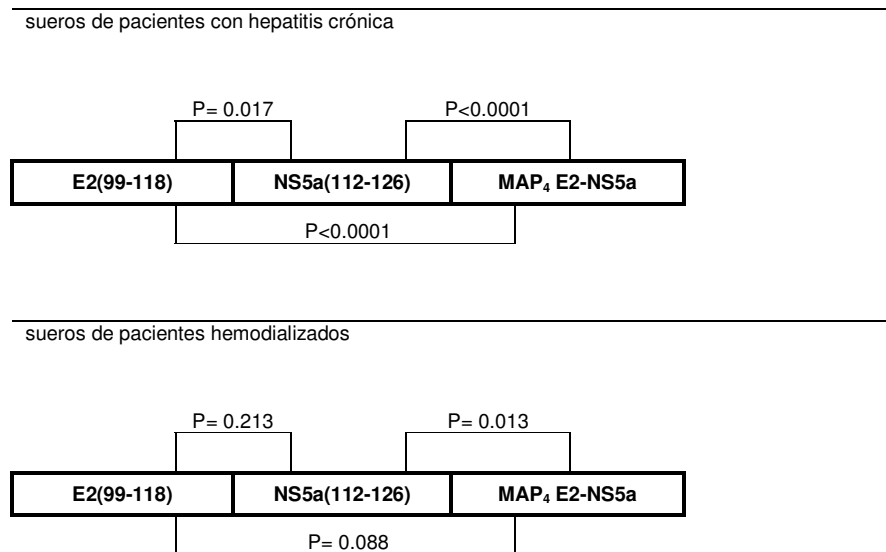
Se estudió la capacidad de la construcción ramificada MAP<sub>4</sub> E2-NS5a para reconocer anticuerpos anti-GBV-C/HGV y se comparó esta capacidad antigénica con la de los péptidos lineales que lo componen, E2(99-118) y NS5a(112-126). En el caso de la construcción MAP, se estudió si el hecho de combinar dos epítomos pertenecientes a proteínas diferentes del virus mejoraba la especificidad y/o la sensibilidad para detectar anticuerpos utilizando el test de ELISA desarrollado. Es importante destacar, además, que cada molécula contiene dos copias de los epítomos seleccionados, por lo que se duplica el número de moléculas susceptibles de reconocer anticuerpos, hecho que se puede traducir en un incremento de la sensibilidad.

La reactividad obtenida por la construcción MAP<sub>4</sub> E2-NS5a con los sueros de pacientes hemodializados fue superior que la que alcanzaron los péptidos E2(99-118) y NS5a(112-126). Con este panel de sueros los dos péptidos lineales exhibieron una reactividad similar (P=0.213) y alcanzaron porcentajes de positividad del 35% y 32%, E2(99-118) y NS5a(112-126), respectivamente, mientras que para la construcción multimérica se alcanzaron reactividades de hasta el 46% (Figura 2.13), demostrando una capacidad significativamente superior para detectar anticuerpos presentes en

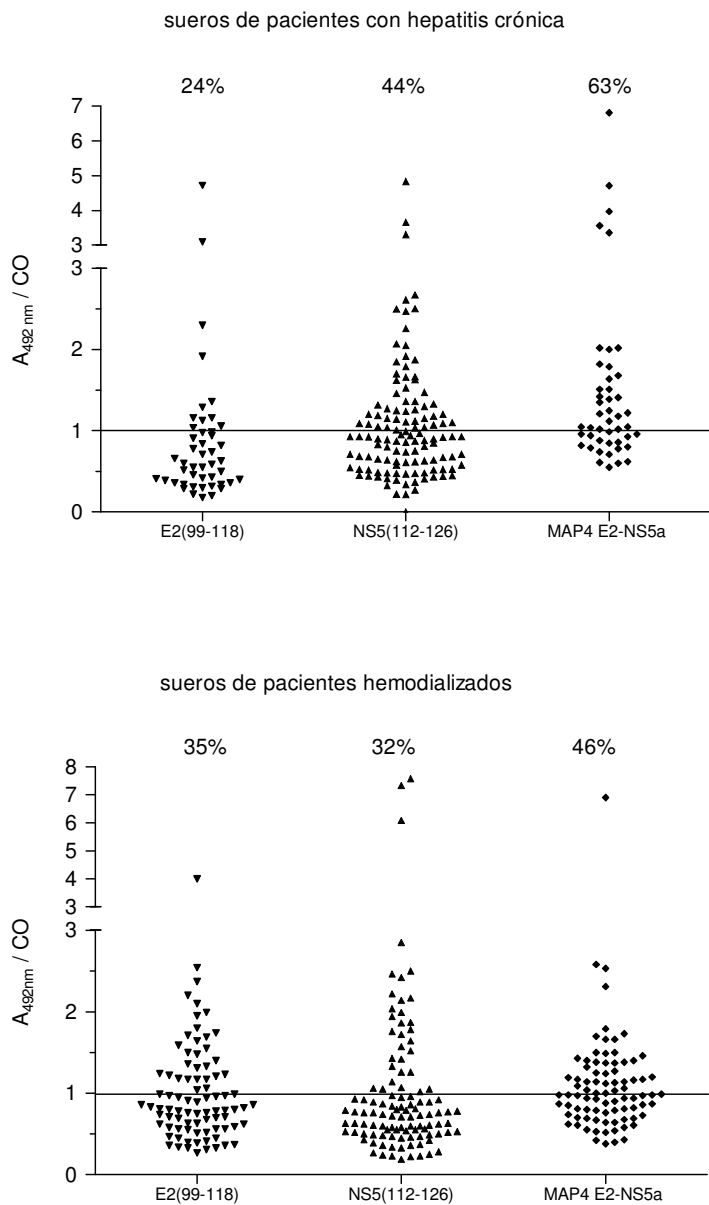
el suero de estos pacientes ( $P=0.088$  y  $P=0.013$ , para E2(99-118) y NS5a(112-126), respectivamente).

Un perfil similar se obtuvo al realizar el análisis con las muestras de sueros de pacientes con hepatitis crónica. En este caso, el péptido E2(99-118) fue el que presentó una reactividad significativamente menor (valores de  $P<0.05$ ) en comparación con las otras dos moléculas comparadas, sin superar el 24% de positividad para estas muestras, mientras que como se comenta en el apartado 2.3.1, la reactividad para el péptido de la región no estructural NS5a(112-126) con estos sueros fue del 44%. Un porcentaje de positividad significativamente superior se observó para la construcción ramificada MAP<sub>4</sub> E2-NS5a, donde hasta el 63% de las muestras analizadas fueron positivas (Figura 2.13); este porcentaje demostró ser significativamente diferente, valores de  $P<0.05$  (Tabla 2.4), respecto a los obtenidos por las secuencias lineales. Con estos resultados se puede concluir, que no sólo el hecho de combinar más de un epítipo en la misma molécula mejora la sensibilidad, sino que duplicar el número de copias también influye de manera positiva en la detección de anticuerpos.

**Tabla 2.4.** Valores P calculados a partir de las reactividades obtenidas para los dos paneles de sueros estudiados al comparar el péptido MP4 E2-NS5a y los péptidos E2(99-118) y NS5a(112-126). Se estableció un intervalo de confianza del 95%, por lo que valores de  $P<0.05$  indican diferencias significativas entre los grupos comparados.







**Figura 2.13.** Reactividad en ELISA de los péptidos E2(99-118), NS5a(112-126) y la construcción multimérica ramificada MAP<sub>4</sub> E2-NS5a con los dos paneles de sueros estudiados. Los sueros se consideraron positivos para valores de  $A_{492nm}/CO \geq 1$ . Los valores en la parte superior de cada columna indican el porcentaje de positividad para cada péptido.

## 2.4 Curvas de rendimiento diagnóstico

La finalidad de cualquier prueba diagnóstica es determinar la presencia o ausencia de un evento patológico concreto, sea infección, sepsis o cualquier otra enfermedad, la cual se debe diagnosticar para poder tratarla adecuadamente. Para ello, se debe saber de antemano la capacidad diagnóstica de cualquier prueba, es decir, debe medirse la precisión-exactitud de una prueba diagnóstica antes de dar por válidos los resultados. El rendimiento diagnóstico de una prueba suele establecerse principalmente mediante la determinación de parámetros como la sensibilidad y la especificidad.

En la interpretación de los resultados existirá una compensación entre sensibilidad y especificidad. La sensibilidad queda definida como la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real es positivo respecto a la condición que estudia la prueba. La especificidad es, sin embargo, la probabilidad de clasificar correctamente a un individuo cuyo estado real sea el definido como negativo [141]. Ambos parámetros están relacionados, y dependen a su vez del punto de corte o umbral que se establezca a partir del indicador cuantitativo, de tal manera que si la regla de decisión impuesta establece un umbral muy bajo para la decisión, se tendrá una alta sensibilidad pero baja especificidad y si, por el contrario, se establece un umbral alto, resultará una prueba con alta especificidad pero baja sensibilidad [142,143].

Si se representan en una gráfica la sensibilidad (verdaderos positivos) frente a 1-especificidad (falsos positivos) obtenidos al considerar todos los posibles valores de corte de la prueba el resultado es una curva de rendimiento diagnóstico (ROC) que proporciona una representación global de la exactitud diagnóstica. La curva representa y recoge la eficacia discriminativa característica de una prueba. Además proporciona un índice de eficacia diagnóstica puro, cualquiera que sea el criterio o punto de corte en el indicador cuantitativo en que se basa la decisión, e incluso independientemente de que dicho indicador esté sesgado. Esta medida resulta extremadamente útil para poder elegir una técnica entre varias en competencia. También estima la probabilidad de diferentes resultados en la tabla de toma de decisiones. De este modo, permiten aislar causas de error en sistemas diagnósticos (por ejemplo, falsas alarmas y omisiones). Por último, proporciona un indicador de criterio de decisión (punto de corte o umbral para la toma de decisión), que permite incluir probabilidades, incluso estimaciones subjetivas de la probabilidad, y costos o utilidades. Este método permite establecer razonadamente reglas o mecanismos óptimos de toma de decisión dentro de un sistema de diagnóstico [144].

El área bajo la curva ROC (AUC) es el parámetro más ampliamente utilizado como indicador de rendimiento diagnóstico. Este valor mide la probabilidad que una persona sana tenga un valor para la variable que se estudia inferior al que tiene un paciente. El valor del AUC puede oscilar entre 0.5 y 1. A mayores valores de AUC, mayor utilidad diagnóstica. Si el test es completamente

indiscriminativo, la curva coincidirá con una línea recta, de pendiente igual a 1, que se corresponderá con una sensibilidad y una especificidad del 50%. Una prueba diagnóstica perfecta tendría un área bajo la curva igual a la unidad. Se consideran pruebas muy precisas aquellas que tienen valores de AUC mayores que 0.9 y pruebas moderadamente precisas las que presentan valores de área bajo la curva comprendidos entre 0.7-0.9 [145]. Comparar el área bajo la curva ROC de diferentes pruebas diagnósticas puede ayudar a seleccionar la prueba más precisa y exacta. Cuanto mayor sea el área bajo la curva, mejor es el test, siempre que las diferencias entre las áreas sean estadísticamente significativas.

Para cada antígeno, en nuestro caso los péptidos, el valor diagnóstico se describe dibujando una gráfica en la que se representa la sensibilidad frente a 100-especificidad obteniendo así la curva de rendimiento diagnóstico. La curva ROC se construye para cada péptido estudiado variando el valor de corte (los valores por debajo de ese valor son considerados negativos y los valores iguales o por encima son considerados positivos). El valor diagnóstico se describe determinando la sensibilidad y la especificidad obtenida para cada valor de corte.

#### **2.4.1 Comparación de la capacidad diagnóstica de las secuencias sintéticas**

La finalidad principal del estudio de las curvas ROC es comparar nuevas pruebas diagnósticas con la de referencia ya existente y poder analizar, de este modo, si con la nueva prueba se mejora la precisión diagnóstica del test de referencia. Para construir la curva ROC se tomarán como controles negativos las muestras que hayan sido negativas para esta prueba de referencia y como muestras problema, las muestras que fueron positivas. Asumiendo que no se dispone de ninguna prueba de referencia para el diagnóstico de la infección por el virus GBV-C/HGV, ya que no existe en el mercado ningún test que permita realizar un serodiagnóstico, para construir las curvas ROC, se tomaron como controles negativos los sueros procedentes de los donantes voluntarios debido a que es el grupo poblacional con un menor riesgo de haber estado en contacto con el virus, y por tanto, de haber pasado la infección. Por otro lado, los sueros analizados procedentes de pacientes hemodializados o bien con hepatitis crónica, pertenecen a un grupo de la población con un riesgo elevado de haber estado en contacto con el virus GBV-C/HGV, y por consiguiente, haber pasado la infección y desarrollado anticuerpos contra éste, por lo que se trata de muestras potencialmente positivas. Así pues, a partir de los valores de absorbancia obtenidos en los ensayos de ELISA comentados anteriormente, se construyeron las curvas de rendimiento diagnóstico tomando como grupo control las muestras de donantes voluntarios y como grupo problema las muestras de pacientes hemodializados y con hepatitis crónica. Se construyeron las curvas para cada una de las secuencias lineales sintetizadas NS4b(8-22), NS5a(112-126), NS4a(27-43), así como para las construcciones quiméricas lineales, Qm1 y Qm2, y ramificadas, MAP<sub>4</sub> E2-NS5a, y las dos

construcciones cíclicas, cyc-HT y cyc-CT. En este caso, los resultados que se desprenden de las curvas ROC se utilizaron únicamente para comparar cuál de todas las construcciones estudiadas es la que presenta una mejor precisión diagnóstica.

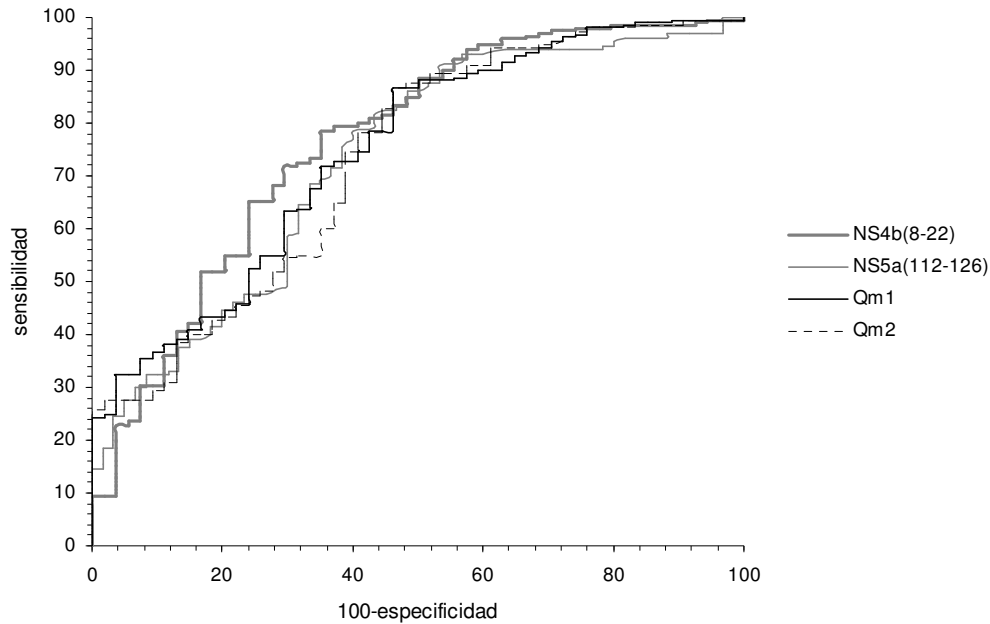
En la Tabla 2.5 se resumen los valores de área bajo la curva obtenidos para las secuencias lineales NS4b(8-22), NS5a(112-126) y sus respectivas construcciones quiméricas Qm1 y Qm2. Como puede observarse, las cuatro secuencias mostraron valores de área bajo la curva superiores a 0.7, indicando que presentan una moderada precisión para diagnosticar la infección por el virus GBV-C/HGV. El péptido lineal NS4b(8-22) fue el que mostró un valor de área bajo la curva superior, sin embargo las diferencias entre las áreas no fueron estadísticamente significativas (valores de  $P < 0.05$ ) en la mayoría de los casos ya que se obtuvieron curvas con perfiles muy similares (Figura 2.14). Únicamente se encontró una diferencia significativa al comparar las áreas obtenidas por la secuencia NS4b(8-22) y su construcción quimérica Qm1. A pesar que la construcción quimérica Qm2 fue la que presentó una mayor reactividad en ELISA (ver apartado 2.3.1) y un área bajo la curva ligeramente superior que la de su homólogo Qm1, las diferencias entre las áreas de estas dos construcciones tampoco resultaron ser significativas, lo que sugiere que la orientación de las secuencias dentro de la molécula no modifica considerablemente la capacidad para reconocer anticuerpos anti-GBV-C/HGV.

**Tabla 2.5.** Valores de área bajo la curva ROC y error estándar calculados para las secuencias NS4b(8-22), NS5a(112-126) y sus construcciones quiméricas Qm1 y Qm2. Comparación de las áreas bajo la curva y nivel de significación de las diferencias.

Péptidos	Área bajo la curva (AUC)	error estándar	95% de intervalo de confianza
NS4b(8-22)	0.764	0.032	0.707- 0.815
NS5a(112-126)	0.719	0.038	0.648- 0.783
Qm1	0.723	0.035	0.663-0.770
Qm2	0.714	0.036	0.648-0.764

construcciones comparadas	diferencia entre áreas	error estándar	nivel significación
NS4b(8-22) vs Qm1	0.041	0.033	$P < 0.05$
NS4b(8-22) vs Qm2	0.050	0.032	0.086
NS5a(112-126) vs Qm1	0.004	0.026	0.947
NS5a(112-126) vs Qm2	0.005	0.039	0.677
Qm1 vs Qm2	0.009	0.033	0.658



**Figura 2.14.** Curvas ROC obtenidas para las secuencias NS4b(8-22), NS5a(112-126) y sus construcciones quiméricas Qm1 y Qm2 .

En la Tabla 2.6 se muestran las áreas bajo la curva obtenidas para las construcciones cíclicas y su homólogo lineal NS4a(27-43). En este caso, el valor del área fue de 0.541 para la construcción lineal, mientras que ambos péptidos cíclicos mostraron áreas bajo la curva superiores 0.614 y 0.687 para cyc-HT y cyc-CT, respectivamente, sugiriendo una mayor capacidad diagnóstica que la secuencia lineal. Tras comparar las áreas, se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre el péptido cyc-HT y su precursor lineal, y puede observarse en la Figura 2.15 como es esta construcción la que presenta curva por encima de los otros dos péptidos. Las diferencias entre las dos construcciones cíclicas no resultaron significativas. Estos resultados concuerdan con los porcentajes de reactividad obtenidos en los ensayos de ELISA, donde se pudo observar una mayor reactividad por parte de las construcciones cíclicas en comparación con la secuencia lineal de la que proceden.

**Tabla 2.6.** Valores de área bajo la curva ROC y error estándar calculados para la secuencia. Comparación de las áreas bajo la curva y nivel de significación de las diferencias.

Péptidos	Área bajo la curva (AUC)	error estándar	95% de intervalo de confianza
NS4a(27-43)	0.541	0.052	0.469- 0.612
cyc-HT	0.614	0.049	0.542- 0.682
cyc-CT	0.687	0.044	0.617- 0.751

Tabla 2.6 (continuación)

construcciones comparadas	diferencia entre áreas	error estándar	nivel significación
NS4a(27-43) vs cyc-HT	0.072	0.047	P=0.123
NS4a(27-43) vs cyc-CT	0.146	0.053	P<0.05
cyc-HT vs cyc-CT	0.073	0.030	P=0.059

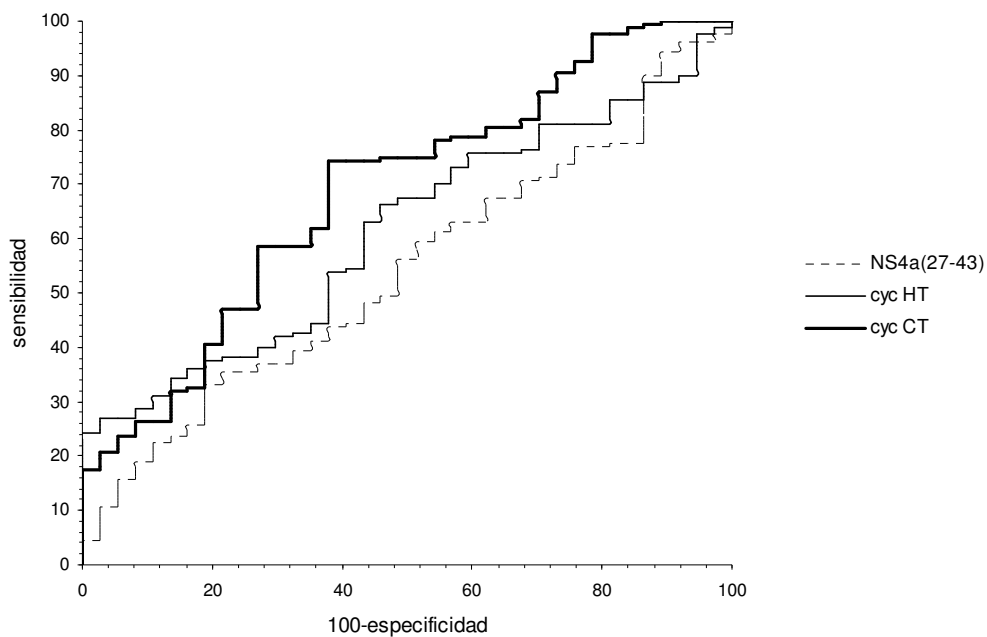


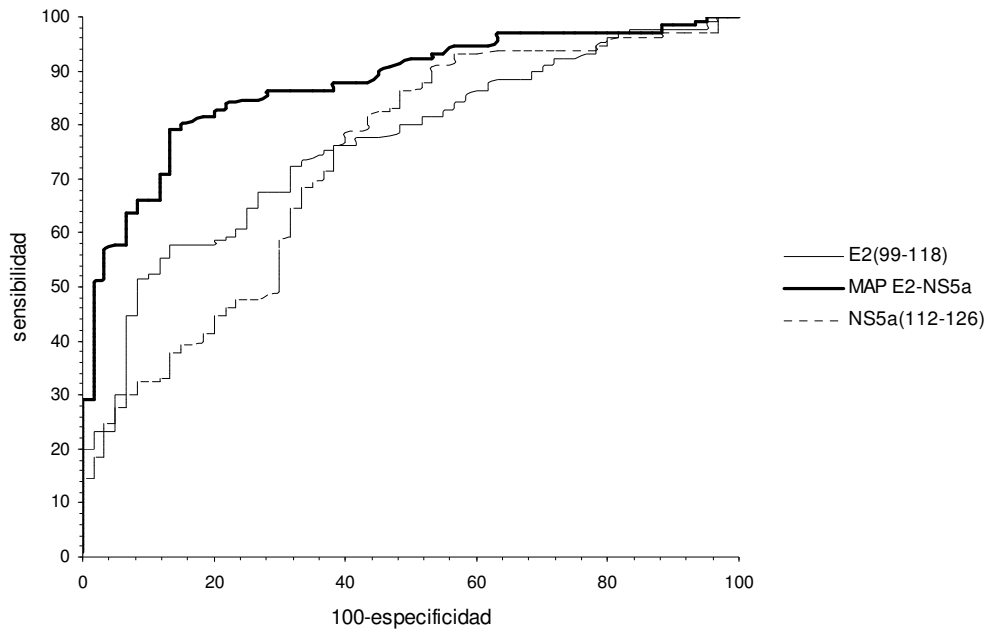
Figura 2.15. Curvas ROC obtenidas para la secuencia NS4a(27-43) y sus derivados cíclicos, cyc-HT y cyc-CT.

Finalmente se realizó el estudio comparativo entre la construcción ramificada MAP<sub>4</sub> E2-NS5a y las secuencias monoméricas que la componen E2(99-118) y NS5a(112-126) (Figura 2.16). Los valores de área bajo la curva obtenidos se muestran en la Tabla 2.7. Como puede observarse, la construcción ramificada mostró un valor de área de 0.874, significativamente superior a las obtenidas por los péptidos E2(99-118) y NS5a(112-126), que fueron de 0.741 y 0.719, respectivamente.

**Tabla 2.7.** Valores de área bajo la curva ROC y error estándar calculados para las secuencias E2(99-118), NS5a(112-126) y su construcción ramificada MAP<sub>4</sub> E2-NS5a. Comparación de las áreas bajo la curva y nivel de significación de las diferencias.

Péptidos	Área bajo la curva (AUC)	error estándar	95% de intervalo de confianza
NS5a(112-126)	0.719	0.038	0.648- 0.783
E2(99-118)	0.751	0.036	0.681- 0.812
MAP <sub>4</sub> E2-NS5a	0.874	0.025	0.819- 0.918

construcciones comparadas	diferencia entre áreas	error estándar	nivel significación
MAP <sub>4</sub> E2-NS5a vs NS5a(112-126)	0.155	0.037	P<0.05
MAP <sub>4</sub> E2-NS5a vs E2(99-118)	0.123	0.036	P<0.05
NS5a(112-126) E2(99-118)	0.032	0.041	0.435



**Figura 2.16.** Curvas ROC obtenidas para las secuencias E2(99-118), NS5a(112-126) y su construcción ramificada MAP<sub>4</sub> E2-NS5a.

Después del análisis de las curvas de rendimiento diagnóstico, se pueden extraer varias conclusiones. En primer lugar, que todas las secuencias sintetizadas en este proyecto, presentan valores para el área bajo la curva ROC mayores que 0.5, lo que indica que las secuencias tienen utilidad diagnóstica para la infección producida por el virus GBV-C/HGV. La secuencia que presentó menor capacidad diagnóstica fue la secuencia lineal NS4a(27-43). A pesar de que los derivados cíclicos de esta secuencia, cyc-HT y cyc-CT mejoraron la capacidad de diagnosticar correctamente la infección por GBV-C/HGV, no presentaron mejor reactividad que las secuencias pertenecientes a las proteínas estructurales NS4b y NS5a y sus construcciones quiméricas Qm1, Qm2. Este hecho es indicativo de que la combinación de más de un epítipo en la misma molécula mejora la antigenicidad de las secuencias construidas. La construcción ramificada MAP<sub>4</sub> E2-NS5a fue la que presentó, con diferencias significativas, una mejor capacidad para reconocer los anticuerpos anti-GBV-C/HGV, lo que sugiere que la combinación de epítopos procedentes de proteínas de envoltura con epítopos de proteínas no estructurales es una buena elección para poder llevar a cabo el diagnóstico por la infección del virus GBV-C/HGV de la manera más precisa y exacta.

A continuación, en la Tabla 2.8, se muestran las sensibilidades obtenidas por ELISA para cada una de las moléculas estudiadas en función del tipo de suero analizado. Debido a que para construir las curvas ROC los dos paneles de muestras, sueros de pacientes hemodializados y sueros de pacientes con hepatitis crónica, se tomaron como un único panel de muestras de pacientes con alta probabilidad de ser positivas, se calculó el promedio de las sensibilidades. Utilizando las curvas ROC se extrapolaron los valores de especificidad correspondiente a los valores de sensibilidad obtenidos.

**Tabla 2.8.** Especificidad de las moléculas estudiadas calculada a partir de las curvas ROC y los valores de sensibilidad alcanzados en ELISA. Columna HD: sensibilidades para los sueros de pacientes hemodializados, columna HC, sensibilidades para los sueros de pacientes con hepatitis crónica.

Péptido	% sensibilidad alcanzada en ELISA			% especificidad según la curva ROC	% Sensibilidad para un especificidad del 99%
	HD	HC	promedio		
NS4b(8-22)	30	30	30	94	10
NS5a(112-126)	32	44	38	91	15
Qm1	35	25	30	96	24
Qm2	36	17	26	98	26
NS4a(27-43)	13	8	10	94	5
cyc-HT	23	26	24	100	24
cyc-CT	18	24	21	97	18
E2(99-118)	35	24	31	93	20
MAP <sub>4</sub> E2-NS5a	46	63	54	98	35



Como se desprende de la Tabla, el rango de sensibilidades mostradas por las distintas moléculas es muy amplio, y oscila entre el 10, mostrado por el péptido NS4a(27-43), y el 54% exhibido por la construcción multimérica. A pesar de esta variabilidad en la sensibilidad, la especificidad mostrada por todas las moléculas fue elevada, superando en todos los casos el 90%, y alcanzando valores de hasta el 98% para la construcción quimérica Qm2 y para la molécula MAP<sub>4</sub> E2-NS5a.

Para comparar mejor la exactitud de cada una de las moléculas se extrapolaron a partir de las curvas ROC los valores de sensibilidad para una especificidad casi ideal del 99%. Como es sabido, el incremento en la especificidad va a expensas de una disminución en la sensibilidad. Según los datos obtenidos, la molécula MAP<sub>4</sub> E2-NS5a sigue siendo la que presenta una mayor sensibilidad (35%), seguida por las construcciones quiméricas lineales, Qm1 y Qm2, que alcanzarían sensibilidades del 24 y 26%, respectivamente, y la secuencia lineal E2(99-118) procedente de la proteína de envoltura E2 que mostraría un 20% de sensibilidad. De este modo, las curvas ROC han demostrado su utilidad en la toma de decisiones a la hora de valorar y comparar las pruebas diagnósticas.

## **2.5 Comparación de la capacidad para detectar anticuerpos anti-GBV-C/HGV de las secuencias sintéticas versus la proteína recombinante E2.**

Como ya se ha comentado con anterioridad, los laboratorios Roche Diagnostics desarrollaron y comercializaron un test para la detección de anticuerpos contra el virus GBV-C/HGV basado en la proteína de estructura E2 (anti-HGV<sub>env</sub>). El test desarrollado consistía en un inmunoensayo en el que la proteína recombinante E2 se utilizaba como antígeno para capturar los anticuerpos anti-GBV-C/HGV [43,45]. A pesar de que ya no está disponible en el mercado, este test ha sido utilizado en muchos de los trabajos publicados para establecer la prevalencia de infección por el virus GBV-C/HGV en poblaciones y su relación en los casos de replicación activa del virus [44,21,42].

Sin embargo, el test comercial no incluía proteínas no estructurales como agentes de diagnóstico, que son las que se han estudiado en esta tesis. Con la finalidad de comparar la capacidad diagnóstica de los péptidos sintetizados con la del test comercial basado en la proteína E2, se estudió el reconocimiento de anticuerpos anti-E2 en algunos de los sueros estudiados en este trabajo.

Se incluyeron en el estudio 35 sueros del panel de sueros de pacientes hemodializados y 36 sueros del panel de sueros de pacientes con hepatitis crónica. Se estudió la presencia de anticuerpos anti-E2 en estos sueros. De los 35 sueros de pacientes hemodializados, 11 fueron positivos para el test comercial, y los otros 24 negativos. Para el panel de sueros de pacientes con hepatitis crónica, 13 de los 36 sueros fueron positivos para el test comercial y 23 negativos.

Posteriormente, se comparó la reactividad frente al test comercial con los resultados obtenidos por las secuencias sintéticas para estos sueros en concreto.

En la Tabla 2.9 se muestran los resultados obtenidos al comparar la reactividad de los sueros de pacientes hemodializados con las construcciones sintéticas y el test comercial.

**Tabla 2.9.** Reactividad en ELISA del test comercial basado en la proteína recombinante E2 en comparación con la obtenida por las construcciones peptídicas no estructurales para el panel de sueros de pacientes hemodializados. Entre paréntesis se muestran los porcentajes de las reactividades.

Sueros de pacientes hemodializados		
	anti-HGV <sub>env</sub> positivos	anti-HGV <sub>env</sub> negativos
NS4b(8-22)	3/11(27)	5/24 (21)
NS5a(112-126)	3/11 (27)	8/24 (33)
Qm1	4/11 (36)	10/24 (41)
Qm2	4/11 (36)	12/24 (50)
NS4a(27-43)	1/11 (9)	4/24 (17)
cyc-HT	5/11 (45)	5/24 (21)
cyc-CT	4/11 (36)	5/24 (21)
E2(99-118)	6/11 (54)	11/24 (46)
MAP <sub>4</sub> E2-NS5a	5/11 (45)	13/24 (54)

Como puede observarse, para las secuencias lineales NS4b(8-22) y NS5a(112-126), el porcentaje de reactividad para los sueros positivos para el test comercial alcanzó valores de hasta el 27%, siendo la reactividad para las secuencias quiméricas Qm1 y Qm2, ligeramente superior, sin superar el 36%. Valores similares de reactividad se observaron para los sueros que resultaron negativos para el test y las secuencias NS4b(8-22) y NS5a(112-126), mientras que el número de muestras positivas detectadas por las secuencias quiméricas fue significativamente superior, 10 de 24 para el péptido Qm1 (41%, P=0.009) y 12 de 24 para el péptido Qm2 (50%, P=0.052). En el caso de los péptidos cíclicos, se observaron sensibilidades superiores, tanto en los sueros positivos como en los negativos para el test comercial, respecto a su homólogo lineal. Al comparar la reactividad del test comercial con la secuencia lineal E2(99-118) se observó que más de la mitad de los sueros positivos para el test fueron positivos también para el péptido. Además, el péptido lineal E2 también es capaz de detectar como positivos 11 de los 24 sueros que no fueron detectados por el test. Finalmente, la secuencia ramificada MAP<sub>4</sub> E2-NS5a, alcanzó reactividades de hasta el 45% con los sueros positivos para el test comercial, mientras que este porcentaje fue superior (54%) para los sueros negativos según el test.

En el caso de los sueros de pacientes con hepatitis crónica (Tabla 2.10), las reactividades con los péptidos en comparación con el test comercial fueron inferiores que para los sueros de pacientes hemodializados, a excepción del MAP<sub>4</sub> E2-NS5a. Tanto las secuencias lineales NS4b(8-22) y NS5a(112-126), como las quiméricas, reaccionaron únicamente con 1 ó 2 de los sueros positivos para el test, mientras que en el caso de los sueros negativos para el test, los péptidos quiméricos detectaron el doble de sueros positivos que sus homólogos monoepitópicos (17% y 9%, para Qm1 y Qm2, respectivamente). Los péptidos cíclicos presentaron una reactividad parecida tanto en los sueros positivos como en los negativos para el test comercial, siendo de alrededor del 8-9%, y tan solo el péptido cíclico cyc-CT, mostró una reactividad superior. La construcción ramificada MAP<sub>4</sub> E2-NS5a, alcanzó valores de reactividad de hasta el 70% para los sueros que ya habían reaccionado positivamente con el test comercial, en detrimento del 36% de reactividad que presentó el péptido lineal E2(99-118). La reactividad fue más moderada para los dos péptidos en el caso de los sueros que no fueron detectados por la proteína recombinante E2, del 17% y 52% para el E2(99-118) y MAP<sub>4</sub> E2-NS5a, respectivamente. A la vista de estos resultados, debería considerarse la incorporación de secuencias pertenecientes a proteínas no estructurales en futuros tests diagnósticos de la infección por el virus GBV-C/HGV dada la considerable sensibilidad de las mismas en el reconocimiento de anticuerpos presentes en el suero.

**Tabla 2.10.** Reactividad en ELISA del test comercial basado en la proteína recombinante E2 en comparación con la obtenida por las construcciones peptídicas no estructurales para el panel de sueros de pacientes con hepatitis crónica. Entre paréntesis se muestran los porcentajes de las reactividades.

Sueros de pacientes con hepatitis crónica		
	anti-HGV <sub>env</sub> positivos	anti-HGV <sub>env</sub> negativos
NS4b(8-22)	1/13 (8)	2/23 (9)
NS5a(112-126)	2/13 (15)	1/23 (4)
Qm1	1/13 (8)	4/23 (17)
Qm2	2/13 (15)	2/23 (9)
NS4a(27-43)	1/13 (8)	1/23 (4)
cyc-HT	1/13 (8)	2/23 (9)
cyc-CT	2/13 (15)	2/23 (9)
E2(99-118)	4/13 (36)	4/23 (17)
MAP <sub>4</sub> E2-NS5a	9/13 (70)	12/23 (52)

## 2.6 Detección de anticuerpos anti-GBV-C/HGV en sueros de pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)

La infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (HIV, del inglés *human immunodeficiency virus*) es la segunda causa mundial de muerte por enfermedades infecciosas. Antes de que se iniciara la era del tratamiento con combinaciones de fármacos antiretrovirales, HAART (del inglés, *Highly Active Anti-Retroviral Therapy*), de entre los 40 millones de personas infectadas en todo el mundo, unos tres millones morían anualmente a causa de la infección por este agente.

La infección por HIV se adquiere mayoritariamente a través de vías por las que también se adquieren otras muchas infecciones virales. Cualquier infección adicional normalmente hace que la infección se desarrolle de manera más severa o conlleva un avance más acelerado de la enfermedad causada por la infección por el HIV. Está descrito que en casos de coinfección con los virus de la hepatitis B y C, el avance de la enfermedad es más acelerado y su pronóstico de mayor gravedad [146,147]. Sin embargo, no siempre las coinfecciones son perjudiciales, como es el caso de los pacientes que han sido sometidos a un transplante de hígado. Se ha observado que las personas coinfectadas con múltiples infecciones provocadas por virus hepatotropos han desarrollado un mejor pronóstico que aquellas personas en que únicamente han sufrido infecciones por un solo tipo de virus [148].

Centrándonos en el contexto del HIV, en 1998 se publicaron datos sorprendentes que mostraron una disminución significativa de la carga viral de HIV [149] y una mejora en el curso de la infección, relacionada con un mayor índice de supervivencia de los pacientes que habían sido coinfectados con los virus HIV y GBV-C/HGV [150].

Hoy día, la presencia del virus GBV-C/HGV se determina por ensayos de PCR. La infección pasada por GBV-C/HGV se ha venido determinando por la detección de anticuerpos dirigidos contra la proteína de envoltura E2 (anti-E2) [44,45]. Tanto el ARN del virus como los anticuerpos anti-E2, se encuentran únicamente en suero, y al desaparecer el material genético del suero, empiezan a detectarse los anticuerpos anti-E2. Sin embargo, existen casos en los que la viremia desaparece sin desarrollar los anticuerpos anti-E2 [37]. Además, parece ser que los anticuerpos anti-E2 protegen de una nueva infección por GBV-C/HGV [151,152]. Sin embargo, se encuentran descritos algunos casos en la literatura de pacientes en los que la desaparición de los anticuerpos anti-E2 en suero va ligada a un empeoramiento de la infección por HIV [51].

Teniendo en cuenta todos estos precedentes, se consideró interesante estudiar el perfil de anticuerpos anti-GBV-C/HGV existente en pacientes infectados por el HIV. Dado que la mayoría de trabajos publicados relacionan la seroconversión con la aparición de anticuerpos anti-E2, debido a que tan sólo se ha analizado la presencia de anticuerpos en las muestras con el test comercial

basado en la proteína recombinante E2, se consideró de interés estudiar la presencia de anticuerpos dirigidos contra dos secuencias peptídicas pertenecientes a dicha proteína. Se seleccionaron dos regiones localizadas en los extremos amino y carboxilo de la proteína ya que suelen considerarse regiones altamente expuestas en la estructura tridimensional de la proteína. Asimismo, se seleccionó una secuencia peptídica localizada en la proteína no estructural NS3, y en último lugar, la construcción multimérica ramificada MAP<sub>4</sub> E2-NS5a, que es la que ha mostrado tener una capacidad antigénica más eficaz de todas las construcciones estudiadas en este trabajo. En la Tabla 2.11 se muestra la estructura primaria de las cuatro construcciones escogidas para realizar este estudio.

**Tabla 2.11.** Estructura primaria de las secuencias seleccionadas para analizar la presencia de anticuerpos anti-GBV-C/HGV en sueros de pacientes infectados por el HIV.

Péptido	Estructura primaria
E2(7-26)	GSRPFEPGLTWQSCSCRANG
E2(348-363)	LLYLMKLAEARLVPLI
NS3(440-460)	AIAYYRGKDSSIHKDGLVVC
MAP <sub>4</sub> E2-NS5a	$  \begin{array}{c}  \text{H-VSWFASTGGRDSKIDVWSLV} \text{---} \text{K} \\  \text{H-GTSGWAEVVVTPTHV} \text{---} \text{K} \\  \text{H-VSWFASTGGRDSKIDVWSLV} \text{---} \text{K} \text{---} \text{K} \text{---} \beta\text{-A-NH}_2 \\  \text{H-GTSGWAEVVVTPTHV} \text{---} \text{K}  \end{array}  $

La síntesis de la molécula multimérica MAP<sub>4</sub> E2-NS5a se encuentra descrita en el apartado 1.3.5 de esta memoria y su capacidad para detectar anticuerpos anti-GBV-C/HGV se ha discutido en el apartado 2.3.4 de este capítulo. Los dos péptidos seleccionados de la proteína de envoltura E2 fueron el E2(7-26), situado en el extremo amino-terminal de la proteína E2, y el péptido E2(348-363), localizado en el extremo carboxilo-terminal de la misma proteína. El péptido E2(7-26) fue sintetizado por Cristina Larios [153] durante el desarrollo de su Tesis Doctoral en la que se estudió la capacidad fusogénica de secuencias peptídicas relacionadas con el virus GBV-C/HGV. Por otro lado, la secuencia lineal E2(348-363) fue objeto de estudio del trabajo realizado por María Dolores Cubero [154] durante el transcurso de su Master Experimental, en el que se compararon las propiedades antigénicas de construcciones químicas constituidas por secuencias lineales de la proteína E2. Finalmente, la secuencia peptídica seleccionada localizada en la proteína no estructural NS3, fue la NS3(440-460). Núria Rojo llevó a cabo la síntesis y los estudios de antigenicidad de dicho péptido para detectar anticuerpos anti-GBV-C/HGV durante el desarrollo de su Tesis Doctoral [91]. Los resultados obtenidos para esta molécula se encuentran publicados en Rojo *et al.* [92].

Se estudió la presencia de anticuerpos frente a los péptidos sintéticos del virus GBV-C/HGV siguiendo el mismo protocolo de ELISA empleado con los sueros de pacientes hemodializados y pacientes con hepatitis crónica estudiados en este capítulo. Sin embargo, al testar estos sueros por ELISA se obtuvieron señales de absorbancia elevadas en los pocillos control en los que no había sido añadido el péptido. Estos resultados indicaron que se estaban dando interacciones inespecíficas entre componentes del suero y alguno de los componentes del ensayo inmunoenzimático. Dada la experiencia del grupo en trabajar con muestras de sueros humanos en ensayos inmunoenzimáticos se decidió utilizar el protocolo de ELISA utilizado también en nuestro grupo [155] que difiere del hasta ahora empleado en los siguientes parámetros (ver apartado 8.3.7):

- en la etapa de bloqueo, en lugar de utilizar tampón PBS-Tween-leche, se empleó una disolución de tampón carbonato/bicarbonato 0.05 M pH 9.6 que contenía un 2% de albúmina bovina sérica (BSA, del inglés *bovine seric albumin*).
- las muestras de suero se diluyeron en tampón RIA suplementado con un 10% de suero bovino fetal, en lugar de utilizar el tampón PBS-T-leche.
- Se utilizó tampón RIA para diluir el conjugado enzimático en lugar de hacerlo en tampón PBS-T-leche.

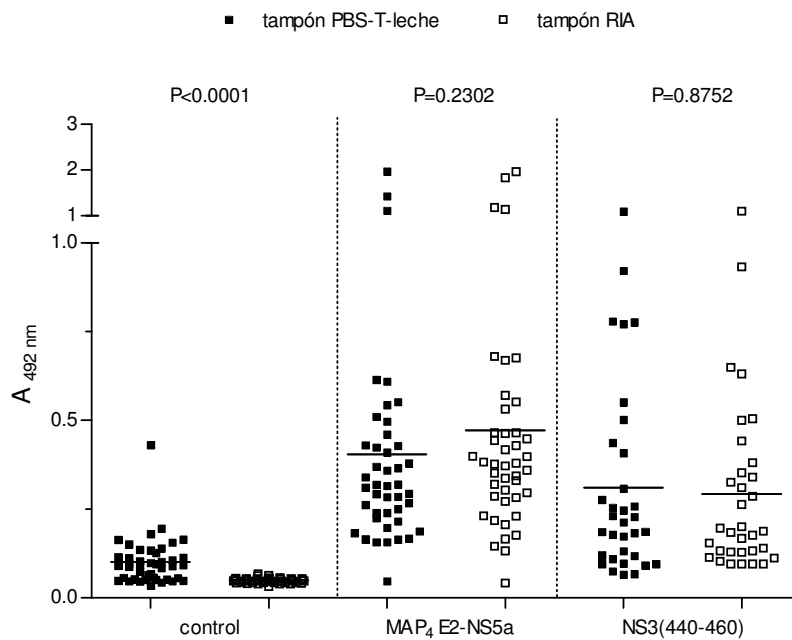
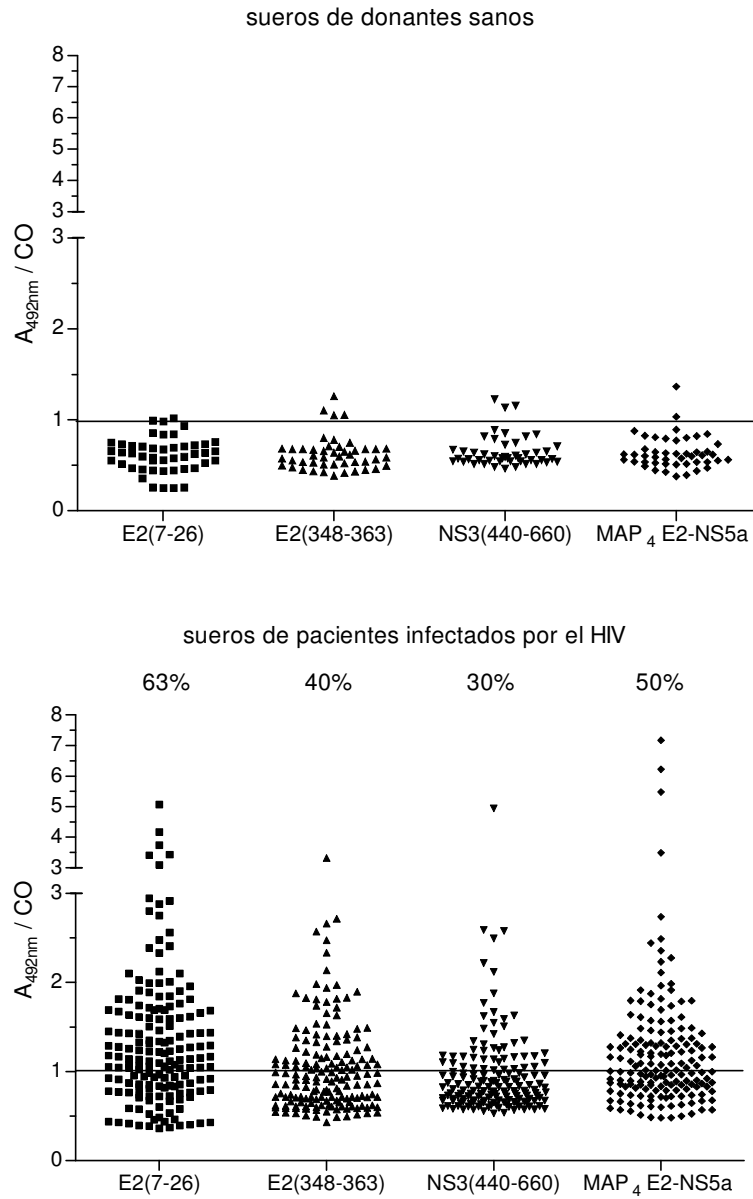


Figura 2.17. Comparación de la reactividad en ELISA según el tampón empleado en la dilución de los sueros.

Para analizar en que grado afectaban estos cambios en la reactividad de los sueros con los péptidos, se realizaron ensayos paralelos con dos de las secuencias peptídicas empleando ambos protocolos de ELISA. En la Figura 2.17 se muestran los resultados obtenidos después de analizar 43 muestras de suero de ambas maneras con los péptidos NS3(440-460) y MAP<sub>4</sub> E2-NS5a. Como puede observarse, las reactividades alcanzadas por los sueros para los distintos péptidos analizados no mostraron diferencias significativas, independientemente del tampón empleado en la dilución de las muestras. No obstante, sí pudo apreciarse una disminución significativa ( $P < 0.001$ ) en los valores de absorbancia alcanzados por las muestras de suero diluidas en tampón RIA cuando no había péptido unido al pocillo. Teniendo en cuenta estos resultados, se optó por realizar el estudio con estos sueros empleando tampones que no contuvieran leche.

Una vez establecido el protocolo, se estudió la reactividad con los péptidos seleccionados con la totalidad de las muestras disponibles. Se estudiaron 164 muestras de sueros procedentes de pacientes infectados por el virus del HIV y 46 muestras procedentes de voluntarios sanos. Estas últimas fueron consideradas controles negativos y partir de ellas se estableció el valor de corte o CO. Este punto de corte, se determinó, del mismo modo que en los casos anteriores, a partir del promedio de las absorbancias de los controles negativos más dos desviaciones estándar. Las muestras con un valor de absorbancia igual o superior al valor de corte calculado se consideraron positivas. Para facilitar la comparación entre los péptidos, se determinó el cociente  $A_{492nm}/CO$ , de modo que aquellos sueros con un valor para dicho cociente igual o superior a 1 se consideraron positivos.

En la Figura 2.18 se muestran las reactividades obtenidas para los sueros infectados por el HIV con cada uno de los cuatro péptidos seleccionados para este estudio. Como puede observarse, todas las construcciones mostraron niveles de reactividad significativos con los sueros problema, mientras que la reactividad que presentaron con los sueros procedentes de donantes sanos no superó el 6%. De los cuatro péptidos estudiados, el péptido E2(7-26) fue el que mostró una mayor sensibilidad (63%), seguido de la construcción multimérica MAP<sub>4</sub> E2-NS5a, que detectó como positivas el 50% de las muestras analizadas. Las secuencias E2(348-363) y el péptido localizado en la proteína no estructural NS3 fueron las dos secuencias que presentaron valores de positividad más bajos, del 40% y 30% para E2(348-363) y NS3(440-460), respectivamente. Estos resultados sugieren que las secuencias seleccionadas mostraron utilidad para reconocer anticuerpos anti-GBV-C/HGV en este tipo de muestras. La proteína de envoltura E2 parece tener más de una región epitópica, tal y como demuestran los altos valores de reactividad obtenidos por los sueros con las secuencias lineales y la construcción multimérica, que contiene dos copias de una secuencia E2(99-118); 126 de las 164 muestras estudiadas fueron positivas con al menos una de las tres construcciones que contienen regiones de la proteína E2. El péptido perteneciente a la proteína no estructural NS3 fue el que demostró una menor antigenicidad.

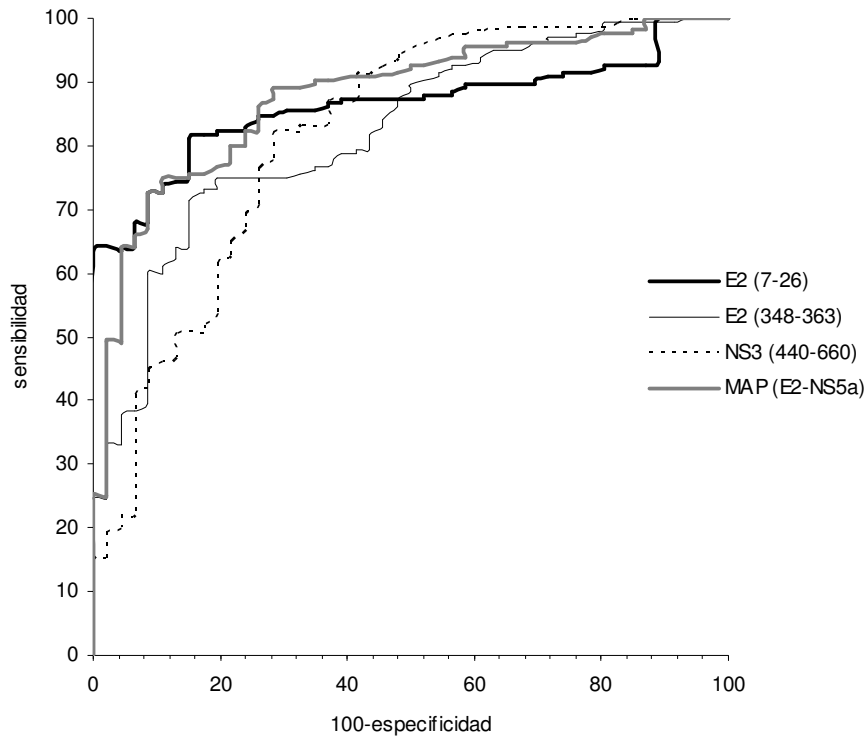


**Figura 2.18.** Reactividad en ELISA de los péptidos E2(7-26), E2(348-363), NS3(440-460) y la construcción multimérica ramificada MAP<sub>4</sub> E2-NS5a con los sueros procedentes de donantes sanos y sueros infectados por HIV. Los sueros se consideraron positivos para valores  $A_{492nm}/CO \geq 1$ . Los valores en la parte superior de cada columna indican el porcentaje de positividad para cada péptido.

Del mismo modo que en los estudios llevados a cabo previamente, se construyeron las curvas de rendimiento diagnóstico (ROC) para poder estudiar comparativamente cual de las cuatro construcciones presentaba una mayor precisión diagnóstica. Para construir las curvas ROC, se tomaron como controles negativos los sueros procedentes de donantes voluntarios y como muestras



problema las 164 muestras de suero positivas para la infección por HIV, ya que pertenecen a un grupo con un elevado riesgo de presentar infección por GBV-C/HGV.



**Figura 2.19.** Curvas ROC obtenidas para las secuencias E2(7-26), E2(348-363), NS3(440-460) y MAP<sub>4</sub> E2-NS5a tras analizar los sueros de pacientes infectados por HIV.

En la Tabla 2.12 se muestran los valores de área bajo la curva y error estándar para cada curva. También se comparan las áreas bajo la curva obtenidas para cada secuencia y el nivel de significación. Como se muestra, todas las secuencias presentaron valores de área bajo la curva por encima de 0.8, lo que clasifica a estas secuencias como pruebas diagnósticas moderadamente precisas [145]. La secuencia ramificada MAP<sub>4</sub> E2-NS5a, fue la que presentó un valor de área más elevado, 0.878, seguido del péptido E2(7-26) con un valor de área bajo la curva de 0.862. Al obtener valores para el área tan similares, en ningún caso se obtuvieron diferencias significativas que pudieran sugerir una mayor utilidad en el diagnóstico de la infección por GBV-C/HGV de una determinada secuencia peptídica.

**Tabla 2.12.** Valores de área bajo la curva ROC y error estándar calculados para las secuencias E2(7-26), E2(348-363), NS3(440-460) y MAP<sub>4</sub> E2-NS5a. Comparación de las áreas bajo la curva y nivel de significación de las diferencias.

<b>Péptidos</b>	<b>Área bajo la curva (AUC)</b>	<b>error estándar</b>	<b>95% de intervalo de confianza</b>
E2(7-26)	0.862	0.026	0.808 – 0.906
E2(348-363)	0.822	0.030	0.763 – 0.871
NS3(440-460)	0.820	0.030	0.761 – 0.869
MAP <sub>4</sub> E2-NS5a	0.878	0.024	0.826 – 0.919

<b>construcciones comparadas</b>	<b>diferencia entre áreas</b>	<b>error estándar</b>	<b>nivel significación</b>
E2(348-363) vs E2(7-26)	0.049	0.030	P=0.174
E2(348-363) vs MAP <sub>4</sub> E2-NS5a	0.056	0.031	P=0.067
E2(348-363) vs NS3(440-460)	0.002	0.032	P=0.950
E2(7-26) vs MAP <sub>4</sub> E2-NS5a	0.016	0.029	P=0.589
E2(7-26) vs NS3(440-460)	0.043	0.033	P=0.199
MAP <sub>4</sub> E2-NS5a vs NS3(440-460)	0.058	0.055	P=0.055

A partir de las curvas se calcularon los valores de especificidad dependiendo de la sensibilidad mostrada en ELISA. Posteriormente, se extrapolaron a partir de la curva ROC, los valores de sensibilidad para una especificidad del 99%. Los valores obtenidos se muestran en la Tabla 2.13.

**Tabla 2.13.** Sensibilidad y especificidad mostradas por cada una de las secuencias del estudio según los ensayos de ELISA y para una especificidad del 99%.

<b>Péptido</b>	<b>% sensibilidad en ELISA</b>	<b>% especificidad</b>
<b>E2(7-26)</b>	63	95
<b>E2(348-363)</b>	40	91
<b>NS3 (440-460)</b>	30	93
<b>MAP<sub>4</sub> E2-NS5a</b>	50	96

Tabla 2.13 (continuación)

<b>E2(7-26)</b>	63	99
<b>E2(348-363)</b>	24	99
<b>NS3 (440-460)</b>	15	99
<b>MAP<sub>4</sub> E2-NS5a</b>	25	99

De los datos de la Tabla se desprende que las sensibilidades obtenidas por ELISA están relacionadas con valores elevados de especificidad, superiores al 90% para las cuatro secuencias. En este caso, al establecer una especificidad del 99% para todas las pruebas, la sensibilidad en la detección de anticuerpos anti-GBV-C/HGV de las secuencias disminuye a valores aproximadamente a la mitad, a excepción de la secuencia E2(7-26) para la que se mantiene una sensibilidad del 63%. De todos estos resultados, se desprende la necesidad de utilizar más de una molécula para realizar un diagnóstico de manera más precisa.

## 2.7 Recapitulación

En este capítulo se muestran los resultados obtenidos tras estudiar el comportamiento antigénico, es decir, la capacidad para reconocer anticuerpos, de las distintas construcciones sintéticas, cuya síntesis, purificación y caracterización se ha discutido en el capítulo anterior.

Para estudiar la capacidad antigénica de los péptidos sintéticos se ha diseñado un ensayo inmunoenzimático tipo ELISA. En este ensayo se han optimizado parámetros como la unión de los péptidos a la fase sólida, la concentración de antígeno a unir a la microplaca y la dilución de suero que proporciona los mejores resultados.

Se ha estudiado comparativamente la capacidad de las construcciones para detectar anticuerpos anti-GBV-C/HGV presentes en muestras de suero procedentes de grupos de la población con un riesgo elevado de haber estado en contacto con el virus, como son los pacientes sometidos a hemodiálisis y los diagnosticados de hepatitis crónica.

Todas las construcciones sintetizadas han mostrado capacidad de reconocer anticuerpos en mayor o menor grado. Si bien, tal y como muestran los resultados de los inmunoensayos realizados, la combinación de más de un antígeno parece ser necesaria para mejorar tanto la sensibilidad como la especificidad de los tests. En este sentido, las construcciones quiméricas lineales Qm1 y Qm2 mostraron ser ligeramente más sensibles en la detección de anticuerpos anti-GVB-C/HGV que las secuencias que lo componen por separado. Este hecho también lo ha demostrado en mayor grado la

construcción ramificada MAP<sub>4</sub> E2-NS5a, que de todas las estudiadas es la que presenta una mayor capacidad para reconocer los anticuerpos presentes en las muestras estudiadas. Este hecho sugiere que para reconocer los anticuerpos de manera eficaz, no únicamente es importante combinar más de un epítipo en la misma molécula, sino que es importante que éstos se encuentren lo suficientemente separados para poder estar más accesibles y permitir así un mejor reconocimiento por parte de los anticuerpos.

Por otro lado, a pesar que la secuencia lineal NS4a(27-43) no presenta una antigenicidad destacable, si que se ha podido observar que la ciclación intramolecular de péptidos lineales incrementa la capacidad antigénica de las moléculas, tal y como han demostrado las construcciones cíclicas, cyc-HT y cyc-CT, que en todos los grupos de muestras estudiados mostraron una mejor capacidad para reconocer anticuerpos respecto a su homóloga lineal.

En cuanto a la utilidad de las secuencias seleccionadas para detectar la infección por GBV-C/HGV en pacientes infectados por el HIV, puede afirmarse que todas ellas han mostrado unos valores de AUC de la curva ROC superiores a 0.8 lo que indica que se trata de pruebas moderadamente precisas. Las secuencias que han demostrado mayor sensibilidad han sido la secuencia lineal E2(7-26) y la construcción ramificada multimérica MAP<sub>4</sub> E2-NS5a. Estos resultados vuelven a poner de manifiesto la utilidad de las construcciones ramificadas multiméricas, en las que se combinan epítopos de proteínas de envoltura y no estructurales.

Finalmente, cabe destacar la buena correlación entre los resultados de ELISA y los resultados obtenidos de las curvas ROC, lo que sugiere la gran utilidad del análisis de las curvas de rendimiento diagnóstico para estudiar comparativamente la precisión diagnóstica de las distintas moléculas candidatas para el desarrollo de un test inmunoenzimático.

