

**DESARROLLO DE UN NUEVO MODELO TEÓRICO DE VACUNA SINTÉTICA
CANDIDATA CONTRA VIH MEDIANTE EL USO DE SIMULACIÓN CON
DINÁMICA MOLECULAR, HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS Y DATOS
FISICOQUÍMICOS**

**ADRIAN CORTES
MIGUEL EDUARDO GUEVARA**



**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2009**

**DESARROLLO DE UN NUEVO MODELO TEÓRICO DE VACUNA SINTÉTICA
CANDIDATA CONTRA VIH MEDIANTE EL USO DE SIMULACIÓN CON
DINÁMICA MOLECULAR, HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS Y DATOS
FISICOQUÍMICOS**

**Trabajo de Grado, presentado como requisito parcial para optar al título de
Químico y Biólogo, respectivamente.**

Por:

ADRIAN CORTES

Estudiante Programa de Química

MIGUEL EDUARDO GUEVARA

Estudiante Programa de Biología

Director:

Patricia E. Vélez V., M.Sc.

Asesor:

Pedro A. Moreno T., Ph.D.



**UNIVERSIDAD DEL CAUCA
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES, EXACTAS Y DE LA EDUCACIÓN
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
POPAYÁN
2009**

DEDICATORIA

A Dios, gracias Señor por permitirme por medio de la ciencia servir a otras personas, a por lo menos tratar por este medio de ayudar a aliviar su sufrimiento.

A mi Madre, mami gracias por tenerme tanta paciencia, por darme todo el apoyo que hasta ahora me has dado, todo lo que soy es gracias a ti.

A Sidney, por todo tu cariño, por tu confianza y apoyo solo puedo decirte gracias, muchas gracias.

A José Luis mi hermanito este es un pequeño paso para mí pero lo he hecho con todo mi esfuerzo, espero que esto te sirva de ejemplo para que tú sigas siendo el gran hombre que eres.

A Johana mi novia, a quien amo con todas mis fuerzas, gracias por ayudarme, por estar para mí siempre, por escucharme y darme las fuerzas que necesite para sacar este proyecto adelante.

Y en especial a mis dos viejitos lindos, gracias por cuidarme y por hacerme el hombre que soy, los amo abuelitos; Isabel y Segundo.

A mis amigos Aníbal Jiménez, Oscar Prada, Juan Carlos Mulcue, gracias por su apoyo y su confianza, pero ante todo gracias por su amistad, sin ustedes tal vez no lo hubiese logrado.

A mis suegros gracias por brindarme todo su apoyo, por abrirme las puertas de su casa y de sus corazones.

A todos aquellos que creyeron y los que no, gracias esto también es para ustedes.

MIGUEL EDUARDO GUEVARA BURBANO

A toda la humanidad,
en un esfuerzo por vencer
el dolor y el sufrimiento.

ADRIÁN CORTÉS

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer a todos nuestros maestros que participaron en nuestra formación universitaria, así como a aquellas que de forma directa nos colaboraron en la realización de este trabajo, muchas gracias.

A la M.Sc. Patricia Vélez y al Ph.D. Pedro Moreno, gracias por su apoyo y confianza, su oportuna dirección y todos sus consejos.

A la Ph.D. Martha Almanza, gracias nuestra querida profesora, usted nos dio fuerza cada día para sacar esta investigación adelante.

A la Ph.D. Irene Tiecher, gracias por su oportuna orientación.

Al Ph.D. Diego Mejía, gracias por tus consejos y apoyo, cada vez que nos tendiste la mano pudimos avanzar otro poco.

A nuestros evaluadores M.Sc. Julio Cesar Klinger y M.Sc. Wayner Rivera Márquez y M.Sc. Carlos Fernando Sánchez, agradecemos su apoyo y confianza en esta empresa.

A todos nuestros amigos del laboratorio de bioinformática y del grupo de investigaciones BIMAC, Adrián Camilo, Adrián Fernando, Alba, John Jairo, John Jaime, Carlos, Edwin, Ember, Luis, Lorena, gracias por su amistad y apoyo.

CONTENIDO

	Pág.
RESUMEN.....	17
INTRODUCCIÓN.....	18
1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 GENERAL.....	24
3.2 ESPECÍFICOS.....	24
4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE.....	25
4.1 VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA.....	25
4.2 GENERALIDADES SOBRE LA PANDEMIA DE VIH.....	25
4.3 ESTRUCTURA Y GENES DEL VIH.....	26
4.4 ASPECTOS INMUNO-MOLECULARES DE LA INFECCIÓN POR VIH.....	28
4.5 CICLO DE REPLICACIÓN DEL VIH-1.....	30

4.6 VACUNAS SINTÉTICAS.....	31
4.6.1 Definición	31
4.7 ASPECTOS FISICOQUÍMICOS DE LAS VACUNAS SINTÉTICAS	31
4.8 PAPEL DE LAS PROTEÍNAS DE CUBIERTA DEL VIRUS DEL VIH PARA LA ELABORACIÓN DE UNA POSIBLE VACUNA	33
4.9 HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES.....	36
4.9.1 Bioinformática	36
4.10 HERRAMIENTAS DE MODELADO	37
4.10.1 ¿Qué es modelado?	37
4.11 CLASIFICACIÓN DEL PROBLEMA DE MODELADO	38
4.11.1 Clasificación del problema como un sistema dinámico	38
4.11.2 ¿Por qué es un sistema dinámico?	38
4.11.3 Variables de estado	39
4.12 DINÁMICA MOLECULAR CLÁSICA	40

	Pág.
4.13 FUNDAMENTOS DE DINÁMICA MOLECULAR.....	41
4.14 INTRODUCCIÓN AL MÉTODO DE SIMULACIÓN	41
4.15 MECÁNICA CLÁSICA.....	44
4.16 FUNCIONES DE ENERGÍA POTENCIAL.....	46
4.17 PAQUETES DE SOFTWARE DE MODELADO.....	47
4.17.1 NanoEnginner-1 (NE1) – GROMACS+HDF5.....	47
4.18 ARCHIVOS DE COORDENADAS MOLECULARES (*.PDB)	48
4.18.1 Líneas de un pdb	49
4.19 HERRAMIENTAS DE VISUALIZACIÓN DE ARCHIVOS *.PDB.....	51
4.19.1 RasMol.....	52
4.19.2 PyMOL.....	53
4.19.3 Swiss-pdbviewer/deepview	53
5. ANTECEDENTES.....	55
6. METODOLOGÍA	59

	Pág.
6.1 MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
6.1.1 Primera fase del estudio	59
6.1.2 Segunda fase del estudio.....	64
6.1.2.1 Desarrollo del modelo computacional CAMD.....	65
6.1.2.2 Características topográficas y electrostáticas del modelo de vacuna	72
6.1.2.3 Longitud de los péptidos y especificad inmunitaria	73
6. RESULTADOS.....	75
7. DISCUSIÓN	80
8. CONCLUSIONES	87
9. RECOMENDACIONES.....	89
BIBLIOGRAFÍA.....	90

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Ejemplo de Secuencias Polimórficas de Aminoácidos de la región V3 de la Proteína gp120 del VIH.....	35
Tabla 2. Líneas de archivo del formato *.pdb.	49

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del VIH-1.....	27
Figura 2. Genoma del VIH tipo 1.....	28
Figura 3. Mecanismo de penetración VIH a linfocitos CD4+	29
Figura 4. Ciclo de replicación del VIH	30
Figura 5. Atractor Extraño de Lorentz	33
Figura 7. Bioinformática	36
Figura 8. Solución de un problema de interacción proteína-proteína.....	38
Figura 9. Interface grafica NanoEngineer-1	48
Figura 10. Interface grafica de RasMol.....	52
Figura 11. Interface de PyMOL.....	53
Figura12. Interface de DeepView.....	54
Figura 13. Conformaciones tridimensionales de un Péptido Sintético	62
Figura 14. Flujograma.....	65
Figura 15. Distribución de epitopes gp120.....	66
Figura 16. Mapa de secuencias del genoma del VIH-1 HXB2	66
Figura 17. Estructura de la gp120.....	67
Figura 18. gp120 clasificación de la estructura por regiones	68
Figura 19. Complejo de unión anticuerpo B12 a gp120.....	69
Figura 20. Regiones de acoplamiento y neutralización del anticuerpo B12.....	70
Figura 21. Interface NE1 estructura primaria del péptido candidato	71

Figura 22. Péptido modelado y renderizado	76
Figura 23. Estructura terciaria del péptido vacuna candidato en NE1	77
Figura 24. Energía potencial en attojulios	77
Figura 25. Energía cinética en attojulios	78
Figura 26. Energía total en attojulios	79

INFORMACIÓN GENERAL DEL PROYECTO

TITULO DE LA PROPUESTA:

“DESARROLLO DE UN NUEVO MODELO TEÓRICO DE VACUNA SINTÉTICA CANDIDATA CONTRA VIH MEDIANTE EL USO DE SIMULACIÓN CON DINÁMICA MOLECULAR, HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS Y DATOS FISICOQUÍMICOS ”

INVESTIGADORES:

ADRIÁN CORTÉS. Estudiante del Programa de Química

MIGUEL EDUARDO GUEVARA BURBANO. Estudiante del Programa de Biología

DIRECTOR:

PATRICIA E. VÉLEZ V., M.Sc.

ASESOR:

PEDRO A. MORENO T., Ph.D.

GRUPO DE INVESTIGACIÓN:

Grupo de Investigaciones en Biología Molecular, Ambiental y Cáncer - “BIMAC”

LUGAR DE EJECUCIÓN:

Laboratorio de Bioinformática. Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y de la Educación.
Universidad del Cauca

DURACIÓN DEL PROYECTO:

1 Año

TIPO DE INVESTIGACIÓN:

Investigación Teórica

PALABRAS CLAVE:

Vacunas Sintéticas, Modelado Molecular, Dinámica Molecular, Bioinformática, Ingeniería de proteínas, Gromacs, Nanoenginner-1, Nanoingeniería,

GLOSARIO

AIDSVAX :

Adquirida(o): con respecto al SIDA, significa que no se transmite por herencia, no es congénita y tampoco aparece por el envejecimiento, sino que se obtiene por alguna de las tres formas de transmisión que son: vía sanguínea, sexual y perinatal.

Antigenicidad: Se refiere en términos de activación inmunitaria, a la capacidad que tiene un antígeno de presentarse como tal.

Antígeno: Molécula que presenta unión a un anticuerpo o a un TCR (Receptor de Celulas T). En el sentido más simple es cualquier sustancia reconocida por el sistema inmune como extraña al organismo.

Atractor: En sistemas complejos, existen convergencias de familias enteras de trayectorias del espacio de fases hacia un conjunto inferior del estado de fases, a este conjunto inferior invariante se le denomina atractor. Estos pueden ser periódicos, cuasiperiódicos y no periódicos.

CAMD: (*Computer-Aided Molecular Design*) *Diseño molecular asistido por computador.* Es el conjunto de procesos que engloban a un número considerable de procedimientos, basados en el uso de computadores, encaminados a relacionar actividad con estructura molecular. Como su propio nombre indica, su fin último es utilizar estas relaciones para predecir ó modelar compuestos con un determinado perfil de actividades.

CCR5 :

CD4 :

Confórmero: cada una de las estructuras de un mismo compuesto que se obtienen al girar, alrededor de enlaces simples, la parte de la molécula situada a un lado del enlace con respecto a la localizada al otro lado del mismo.

Coulombio: Es la unidad del Sistema Internacional de cantidad de electricidad y carga eléctrica, equivalente a la cantidad de electricidad transportada en un segundo por una corriente de un amperio.

Cuasiespecies víricas: Virus muy estrechamente relacionados pero diferentes. Por ejemplo: En un mismo sujeto infectado ha sido posible observar entre un 1 y un 6% de variaciones víricas por lo que algunas veces se habla de que en un paciente existen “cuasiespecies” del virus.

Epitopes: Porción específica de un antígeno o proteína al cual se une un anticuerpo.

Infecciones oportunistas: La repetición exponencial del ciclo de replicación del VIH conlleva a que el número linfocitos T CD4+ baje en número, lo cual

disminuye ó imposibilita la defensa contra otros patógenos infecciosos, lo que provoca que aparezcan nuevas enfermedades llamadas "infecciones oportunistas", muchas de las cuales en condiciones normales conviven sin peligro con el organismo humano en el que se hospedan, pero que aprovechan la oportunidad provocada por la destrucción de las defensas, para aparecer como enfermedades graves que incluso llevan al paciente a la muerte.

Ingeniería de proteínas: Trata del diseño *de novo* de una proteína, es decir, crear una proteína indicando la secuencia y que a su vez esta se pliegue como uno desea, y que a partir de ella se desarrolle la función prevista (esta función no necesariamente es una que esté presente en el ser vivo). Dada su complejidad requiere conocimientos en diversas áreas: bioquímica, biología, físico-química, bioinformática. etc.

Inmunodeficiencia: significa que el sistema inmunológico está disminuido y no es capaz de defender eficazmente al organismo contra el ataque de microorganismos.

Inmunogenicidad: Propiedad de un antígeno de generar una respuesta inmunitaria. No todos los antígenos son inmunógenos. Por ejemplo, los de bajo peso molecular pueden no estimular una respuesta inmunitaria a menos que estén unidos a macromoléculas.

Modelamiento: Es el proceso de reconstrucción de un proceso natural de su medio a una forma llamada modelo. Para el cual pueden usarse las ecuaciones, restricciones y elementos de control del modelo para ajustarse.

Modelo: Es un dispositivo que ayuda al modelador a predecir o explicar el comportamiento de un fenómeno, experimento o suceso.

Pandemia: Enfermedad infecciosa que se extiende a muchos países.

Plugins: es una aplicación informática que interactúa con otra aplicación para aportarle una función o utilidad específica.

Propiedades globales emergentes: En sistemas complejos, las propiedades de un todo generado es mayor que la suma de las propiedades individuales de dichos elementos que conforman el sistema.

Septicemia: Forma de infección generalizada que puede provocar la muerte. Los síntomas son cambios en el ritmo cardiaco y en la temperatura, confusión mental y fuerte ataque al estado general.

Seroconversión: Cambio de una prueba serológica negativa a positiva, que indica el desarrollo de anticuerpos en respuesta a la presencia de un antígeno. La seroconversión también puede ser de positiva a negativa. En el caso del

VIH la seroconversión ocurre aproximadamente a las cuatro semanas de que el virus ha penetrado en el organismo, aunque algunas veces tarda meses.

Sincisio ó Sincitio: Agrupamiento anormal de células que unen sus membranas formando grandes conglomerados. Las células infectadas por el VIH frecuentemente se fusionan de esta manera con las células sanas cercanas creando una célula gigante. Estudios en laboratorio han mostrado que este fenómeno está asociado a la muerte de células sanas y es un factor para el avance rápido de la enfermedad en quienes la padecen.

Síndrome de inmunodeficiencia adquirida. (SIDA): Síndrome es el conjunto de síntomas que se presentan independientemente de las causas que lo provocan; en el caso del SIDA, en realidad se habla de un conjunto de síndromes, como el síndrome de insuficiencia respiratoria, síndrome de mala absorción intestinal, síndrome meníngeo y otros más, habitualmente con predominio de uno de ellos. En estricto sentido el SIDA es el último estadio de la enfermedad provocada por la infección con el virus de la inmunodeficiencia humana VIH, en que aparecen una serie de infecciones en los pulmones, cerebro, ojos y otros órganos, pérdida de peso, diarrea y un tipo de cáncer llamado sarcoma de Kaposi. De acuerdo con la definición oficial publicada por la CDC (Control Disease Center) de los Estados Unidos de Norteamérica, una persona recibe un diagnóstico de SIDA cuando tiene una cuenta de CD4 menor a 200 o cuando aparecen ciertas infecciones oportunistas. Actualmente se considera de gran importancia la cuantificación de la carga viral como un indicador del avance y pronóstico de la enfermedad, así como para la administración y control de tratamientos. Entre la transmisión y el desarrollo de la enfermedad pueden transcurrir más de 10 años; el promedio de vida para una persona con diagnóstico de SIDA es de dos años. **Ver: Infecciones oportunistas, adquirido.**

Sintético: Producto de un proceso químico aun cuando contenga elementos de la naturaleza. Se usa como contrario a procedencia natural.

Template: Marco base para la construcción de algo, es una plantilla que se usa para la construcción o modelado de un problema.

Viremia: Presencia de virus en la sangre.

RESUMEN

Se saben más cosas del VIH (el virus de la inmunodeficiencia humana que causa el SIDA) que de ningún otro virus en humanos, pero la formulación de una vacuna que pueda protegernos de él ha sido una tarea, hasta la fecha, infructuosa. Parte del problema reside en que a diferencia de la respuesta somática a las infecciones víricas más agudas, la respuesta inmune natural contra el virus VIH no es capaz de controlar la infección, de hecho, en las primeras etapas de progresión de la infección el sistema inmune puede llegar a disminuir la carga viral a un nivel casi indetectable, pero luego la respuesta del sistema inmune se hace ineficiente y empieza a progresar la infección. La alta tasa de replicación del virus en el organismo, unido a los mecanismos de evasión de la respuesta inmune mediante mecanismos de polimorfismos de proteínas y baja inmunogenicidad ha ocasionado que todos los intentos para obtener una vacuna eficaz contra el virus hayan fracasado. Cada estrategia para el diseño de vacunas anti-VIH ha presentado inconvenientes diferentes que las hacen disfuncionales contra el virus.

Se modeló un péptido vacuna candidato contra VIH, teniendo en cuenta la dinámica infecciosa del virus, los mecanismos de evasión que emplea el virus contra la respuesta inmunitaria y finalmente aplicando ingeniería de proteínas para simular el modelo de vacuna propuesto y la optimización del mismo por medio de simulación con dinámica molecular en NE1 y GROMACS, la visualización y análisis de estructuras terciarias se llevo a cabo con herramientas bioinformáticas, por lo cual se obtuvo un péptido sintético monomérico de estructura terciaria tipo hoja beta antiparalela, el cual es presentado en su estado de mínima energía, el cual reúne propiedades de estabilidad que lo convierten en una gran alternativa como vacuna anti-VIH

INTRODUCCIÓN

Dentro de los adelantos más grandes en el siglo XX de la ciencia médica están la invención y uso de vacunas contra un gran número de agentes patógenos infecciosos, sin embargo, a pesar del gran avance tecnológico en la actualidad, no existen aun vacunas funcionales contra muchos de ellos, como es el caso del virus de la inmunodeficiencia humana VIH, malaria, tuberculosis entre otros (84). No obstante, el nuevo reto para la investigación y desarrollo de nuevas vacunas se centra en el aprovechamiento de la interdisciplinariedad de conocimientos y en la aparición de nuevas herramientas para la investigación, como son el desarrollo de nuevas propuestas matemáticas (modelamiento) y computacionales (Bioinformática), entre muchas otras (8).

Uno de los mayores sueños en biología molecular, es el de poder crear proteínas sintéticas que se plieguen de la forma deseada y que por lo tanto desarrollen una función prevista (que no tiene que ser necesariamente una función presente en los seres vivos) (35). La ingeniería de proteínas, ha permitido vislumbrar este panorama, permitiendo el diseño y aparición de algunas pequeñas proteínas sintéticas en búsqueda de funciones particulares (16,17, 75). Si bien es mucho lo que se ha avanzado en este campo aun queda no menos por saber, en especial, de la energética, plegamiento y estabilidad de proteínas.

La bioinformática y el modelado computacional de proteínas, aprovechan la enorme capacidad de cálculo de los computadores modernos, esto debido a que la constante evolución tecnológica, ha llevado a las computadoras a tal punto, que se pueden hacer trillones de cálculos por segundo, lo cual ha permitido elaborar programas que puedan procesar enormes cantidades de datos. En la actualidad la supercomputadora más potente del planeta (Blue Gene, la cual se utiliza en bioinformática) puede realizar 280.6 trillones de operaciones por segundo (97). Sin embargo esta capacidad impresionante es aún insuficiente cuando se habla de procesar datos biológicos (8,35). Las simulaciones de proteínas quizás sean los fenómenos más complejos y más costosos en tiempo de procesamiento computacional en la actualidad, pero a pesar de esto, todos los esfuerzos se centran en aprovechar las herramientas con las que se cuenta a la fecha, las cuales permiten acercarse al problema de una manera más que aceptable.

Los métodos computacionales usados para simular el comportamiento molecular, son hoy día una de las principales herramientas para la investigación en ingeniería de proteínas, ya que permiten calcular la trayectoria de evolución del sistema

molecular dependiente del tiempo, permitiendo así, el estudio de procesos dinámicos complejos que suceden en estos sistemas biológicos a nivel molecular (12,35). Estas investigaciones son innovadoras y de actualidad, lo que pone la presente investigación a la vanguardia de la ciencia y la deja como precedente para su aplicación en otras áreas del conocimiento.

Con esta investigación se logra proponer un nuevo modelo de diseño de vacuna sintética candidata ideal, en el cual se aporta a la solución, de algunas de las deficiencias que presentan los demás modelos de vacunas desarrollados hasta el día de hoy contra VIH, entre las cuales se encuentran las vacunas de virus atenuados, las vacunas obtenidas por ingeniería genética, las de DNA desnudo y con especial interés las vacunas sintéticas convencionales.

1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) está causado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Este virus pertenece al género de los lentivirus, familia *retroviridae*, familia de todos de los retrovirus animales, y el cual es capaz de producir en las células infecciones latentes a largo plazo y efectos citopáticos a corto plazo, produciendo enfermedades lentamente progresivas y mortales (1). Este virus ha generado una pandemia que ha contagiado a más de 47 millones de personas y ha causado la muerte de casi 16 millones de adultos y niños. Datos recientes indican que solamente en África mueren 300 personas cada hora debido a los efectos del virus del SIDA (59).

El VIH es un retrovirus que utiliza la maquinaria celular para replicarse, lo cual lo hace extremadamente mutable, ya que este codifica una enzima, la transcriptasa reversa, la cual por su baja precisión en la replicación induce una alta tasa de mutación (52). La alta tasa de mutación es la principal causa de la evasión del virus, su consecuencia, es el polimorfismo antigénico o polimorfismo de secuencias proteicas, esto hace al virus muy variable y resistente tanto a la presión del sistema inmune, como a fármacos y a llevado al fracaso a los diversos tipos de vacunas que se han intentado contra este. Esto ha generado que muchos investigadores piensen que es imposible crear una vacuna contra este patógeno viral. Al respecto, David Baltimore Premio Nobel de medicina, opina:

"Si llevamos veinte años diciendo que en diez años se encontrará una vacuna, es casi una obligación preguntarse ¿realmente sucederá? Algunas personas afirman que nunca ocurrirá".

"Hemos trabajado para encontrar una vacuna contra el VIH desde que el virus se descubrió (...) Y ahora no estamos más cerca de encontrar una vacuna de lo que lo estábamos entonces"

David Baltimore, Premio Nobel de Medicina (9).

Se han realizado muchas investigaciones con la intención de elaborar una vacuna contra el VIH, por diferentes metodologías; vacunas biológicas, vacunas de ADN, vacunas recombinantes, vacunas sintéticas, sin embargo ninguna vacuna fue funcional, de estas investigaciones tal vez las que hicieron crecer las esperanzas de que se pudiera crear una vacuna efectiva contra el VIH, fueron las que funcionaban vía anticuerpos. Estas vacunas fueron diseñadas de proteínas de

superficie del virus, en pruebas in-vitro ellas desencadenaron la producción de anticuerpos inmunizantes, bloqueando su capacidad de infectar linfocitos humanos cultivados. Por desgracia, los anticuerpos no reconocieron más que a las cepas de VIH que eran idénticas a las utilizadas para producir las vacunas. Estos anticuerpos fueron ineficaces a la hora de neutralizar las cepas de VIH obtenidas directamente de los pacientes infectados, al final estas eran perfectamente capaces de infectar otros cultivos de células. Después de muchos intentos fallidos, se ha generado pesimismo con respecto a la creación de una vacuna contra el VIH, pero a pesar de esto, aun se continúa con la labor de tratar de encontrar una vacuna funcional contra este patógeno mediante diferentes metodologías (1, 59).

El presente trabajo es presentado como una alternativa de abordar un problema tan complejo como lo es el desarrollo de una vacuna, para el objeto de esta investigación, se desarrollo un modelo de péptido vacuna sintética candidata ideal contra el VIH, en el cual se trato de contribuir en la solución de algunas deficiencias de los demás modelos de vacunas, con particular interés en las vacunas sintéticas convencionales.

HIPÓTESIS:

De manera general:

“Es posible proponer un modelo de vacuna sintética basado en simulación con dinámica molecular que permita potencialmente evitar la infección de VIH”

De manera específica:

“Es posible evitar la infección del VIH, mediante la creación de una vacuna sintética que desencadene inmunidad vía anticuerpos”

2. JUSTIFICACIÓN

Cuando nos adentramos en la tercera década de la pandemia del SIDA y a pesar de los enormes esfuerzos y los miles de millones de dólares invertidos en investigación, se sigue careciendo de una vacuna eficaz contra el VIH, agente etiológico causante del SIDA (79). A medida que crecen de forma imparable las cifras de personas infectadas por el VIH y de fallecidos a causa del SIDA, se hace más urgente la necesidad de crear una vacuna. En la actualidad existen diversas vacunas candidatas en distintas fases de desarrollo, muchas de las cuales en distintas pruebas han presentado resultados desesperanzadores (3, 79).

En el campo de las enfermedades infecciosas, dentro de los muchos problemas que se presentan, se encuentra la escasa vacunación registrada en las naciones en desarrollo; esto ha perjudicado la investigación sobre vacunas. La falta de un mercado en esos países no ofrece incentivos suficientes para que las empresas inviertan en el desarrollo de vacunas contra las enfermedades que afectan predominantemente a los pobres. Esto menoscaba el desarrollo de vacunas contra enfermedades como la disentería por *Shigella*, el dengue, la encefalitis japonesa, la leishmaniasis, la esquistosomiasis y el cólera. (73)

La situación de los mercados de los países en desarrollo también afecta la investigación y desarrollo de vacunas más apropiadas contra las cepas existentes y causantes de enfermedades mundiales. Por ejemplo, mientras que una vacuna con alguna eficacia para prevenir el VIH/SIDA ahora se ve como posiblemente obtenible dentro de los próximos 10 años, solo se ha realizado un ensayo clínico de esa vacuna en África, el continente que sobrelleva el 70% de la carga mundial de VIH. Una vacuna europea, norteamericana o asiática contra el VIH podría no ser apropiada para una población africana. Esto ha llevado a pensar que el desarrollo satisfactorio de vacunas preventivas eficaces contra el VIH, obligue a estudiar simultáneamente muchas vacunas candidatas en diferentes poblaciones de todo el mundo (73, 90).

La carga mundial de la morbilidad y de la mortalidad relacionada con el VIH está creciendo a un ritmo que no es comparable con el de ningún otro patógeno. En muchos países, el SIDA ya es la principal causa de mortalidad (6). Los tratamientos disponibles no son adecuados porque no conducen a la curación, sino que, en el mejor de los casos, reducen la progresión de la enfermedad. El tratamiento más eficaz para frenar la progresión de la enfermedad relacionada con

el VIH es la terapia anti-retrovírica, la cual es difícil de administrar, requiere una estricta supervisión médica, es extremadamente costosa y puede causar efectos adversos significativos (19, 94). Debido a esto y desde el punto de vista económico, la mayoría de las personas afectadas por el VIH no pueden disponer fácilmente de terapia anti-retrovírica, ya que en su gran mayoría son personas que viven en países en desarrollo y en comunidades marginales de los países desarrollados. Por tanto, existe el imperativo ético y social de buscar, con la mayor urgencia posible, una vacuna eficaz y accesible universalmente que complemente otras estrategias de prevención, ya que un programa de vacunación resulta más económico, más fácil de llevar a cabo y con frecuencia más eficaz que otros proyectos de salud pública que actualmente están en funcionamiento (como campañas de prevención, suministro de medicamentos, etc.) (73).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

Desarrollar un nuevo modelo de vacuna sintética candidata contra el VIH, mediante el modelado computacional de un péptido vacuna sintética ideal, al cual se le verificarán sus propiedades iniciales por medio de simulación con dinámica molecular.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Identificar las deficiencias de los diferentes tipos de vacunas que se han generado contra el VIH.
- Plantear un modelo ideal de Vacuna que posea todas las características óptimas de funcionalidad y de las cuales carecen los modelos de vacunas estudiados.
- Realizar un análisis de secuencias de la gp120 del virus definiendo blancos antigénicos.
- Modelar un péptido vacuna ideal por ingeniería de proteínas (diseño molecular asistido por computador CAMD).
- Verificar las propiedades iniciales del modelo mediante la simulación por dinámica molecular.
- Realizar un análisis de secuencias proteicas del péptido sintético (vacuna) obtenido para revisar la homología con secuencias de proteínas expresadas por los linfocitos, publicadas en bases de datos de libre acceso.

4. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

4.1 VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH)

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) está causado por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Este virus pertenece al género de los lentivirus, familia *retroviridae*, esta es la familia de todos de los retrovirus animales. Los Lentivirus, entre los que se incluyen los virus visna ovino y los virus de inmunodeficiencia bovina, felina y simia, son capaces de producir en las células infecciones latentes a largo plazo y efectos citopáticos a corto plazo, y todos ellos producen enfermedades lentamente progresivas y mortales (1).

Se han identificado dos variantes íntimamente relacionadas de VIH, denominadas VIH-1 y VIH-2. El VIH-1 es, con diferencia, la causa más frecuente de SIDA, pero el VIH-2, se diferencia del VIH-1 en que la enfermedad que produce es menos agresiva, parece evolucionar más lentamente hacia la destrucción del sistema inmunitario, su transmisión vertical (madre-hijo) parece ser más difícil y existe variación en la regulación del virus a nivel genético; los genomas del VIH-1 y VIH-2 tienen una similitud de sólo el 40-50% y el VIH-2 presenta una homología del 75% con el virus de la inmunodeficiencia de los simios (SIV). Sin embargo ambos ocasionan una enfermedad clínicamente indistinguible (1, 52).

4.2 GENERALIDADES SOBRE LA PANDEMIA DE VIH

Se saben más cosas del VIH (el virus de la inmunodeficiencia humana que causa el SIDA) que de ningún otro virus en humanos. Pero la formulación de una vacuna que pueda protegernos de él es una tarea casi tan imponente ahora como cuando se descubrió el virus. Parte del problema reside en que, a diferencia de la respuesta somática a las infecciones víricas más agudas, la respuesta inmune natural contra el virus VIH no es capaz de controlar la infección, de hecho, en las primeras etapas de progresión de la infección el sistema inmune puede llegar a disminuir la carga viral a un nivel casi indetectable, pero luego la respuesta del sistema inmune se hace ineficiente y empieza a progresar la infección (28, 59, 79). Más de 40 millones de individuos han sido contagiados por el VIH desde principios de los años 80 y casi 14 millones han muerto (dejando al menos 9 millones de huérfanos), según informes del UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV-1/AIDS), un programa patrocinado por las Naciones Unidas. Sólo en 1997, unos

seis millones de personas -cerca de 15.000 por día- adquirieron el VIH y unos 2,3 millones sucumbieron a él, entre ellos 450.000 niños (59).

La propagación del VIH es especialmente rápida en el África subsahariana y en el sudeste asiático. La zona situada en el sur del Sahara alberga ahora las dos terceras partes de la población mundial infectada por el VIH y alrededor del 90% de todos los niños infectados. En algunas regiones de Bostwana y de Suazilandia y en algunas provincias de Sudáfrica uno de cada cuatro adultos está infectado (6).

Los niños infectados de VIH tienen más dificultades que los adultos para mantenerse bien, pues el virus tiende a ser más agresivo en los pequeños, llevando con más rapidez a la disfunción inmunitaria que es el SIDA y a la muerte. Actualmente hay en el mundo alrededor de dos millones de niños infectados y cada día vienen a sumársele alrededor de 1500, padeciéndose sobre todo esta desgracia en los países en vía de desarrollo (6, 73).

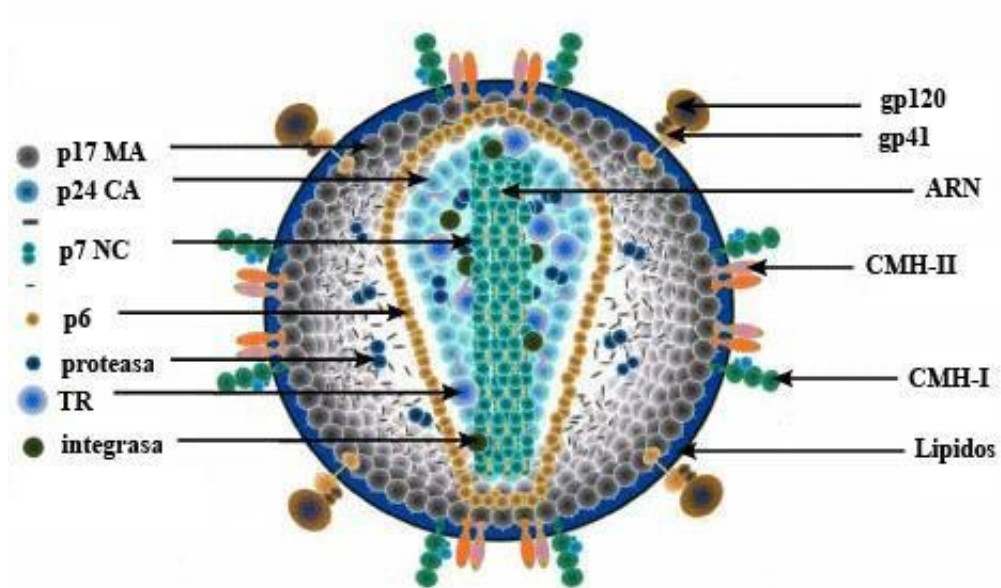
La virulencia del VIH en los niños se hace muy pronto evidente, solíéndose manifestar los síntomas de la infección con mucha más rapidez que en los adultos. Gran parte de los niños infectados –hasta un 16%– mueren antes de cumplir cuatro años por la rápida destrucción de su sistema inmune. Apenas iniciado el curso de la enfermedad, el VIH puede invadir el cerebro infantil, órgano que se está configurando, por lo que la invasión vírica puede obstaculizar el desarrollo de la inteligencia y deteriorar las funciones motoras, dando origen a problemas de coordinación, normalmente de carácter permanente (70). A partir de la infección, el VIH se reproduce en un promedio de 10 mil millones de nuevas copias por día. Al mismo tiempo, el sistema inmunológico produce 2 mil millones de células CD4 para luchar y contrarrestar sus efectos (64, 23, 36).

4.3 ESTRUCTURA Y GENES DEL VIH.

El VIH es un virus esférico de 100 nm de diámetro, el cual posee a grandes rasgos tres componentes estructurales fundamentales: la envoltura, formada por una bicapafosfolipídica derivada de la membrana celular del huésped, que además incluye proteínas de membrana codificadas por el virus (Figura 1.); una matriz proteica esférica y una cápside cónica que contiene el genoma, formado por dos cadenas idénticas de ARN lineal, cada una de unas 9.2 kilobases (kb) de longitud. Además, dentro de la cápside se encuentran las proteínas del VIH Vpr, Nef y Vif, y las enzimas transcriptasa reversa, integrasa y proteasa (1, 52).

El genoma del VIH-1 contiene nueve genes; el gen Gag codifica para las proteínas estructurales de la cápside (p24), de la nucleocápside (p6) y de la matriz (p17). El gen Pol codifica para las enzimas proteasa, transcriptasa reversa e integrasa, mientras que el gen Env codifica para las moléculas de la superficie viral gp41 y gp120. Los seis genes restantes codifican para proteínas no estructurales: los genes Tat y Rev codifican para las proteínas reguladoras, y los genes Vpu, Vpr, Vif y Nef codifican para proteínas denominadas accesorias (52, 64).

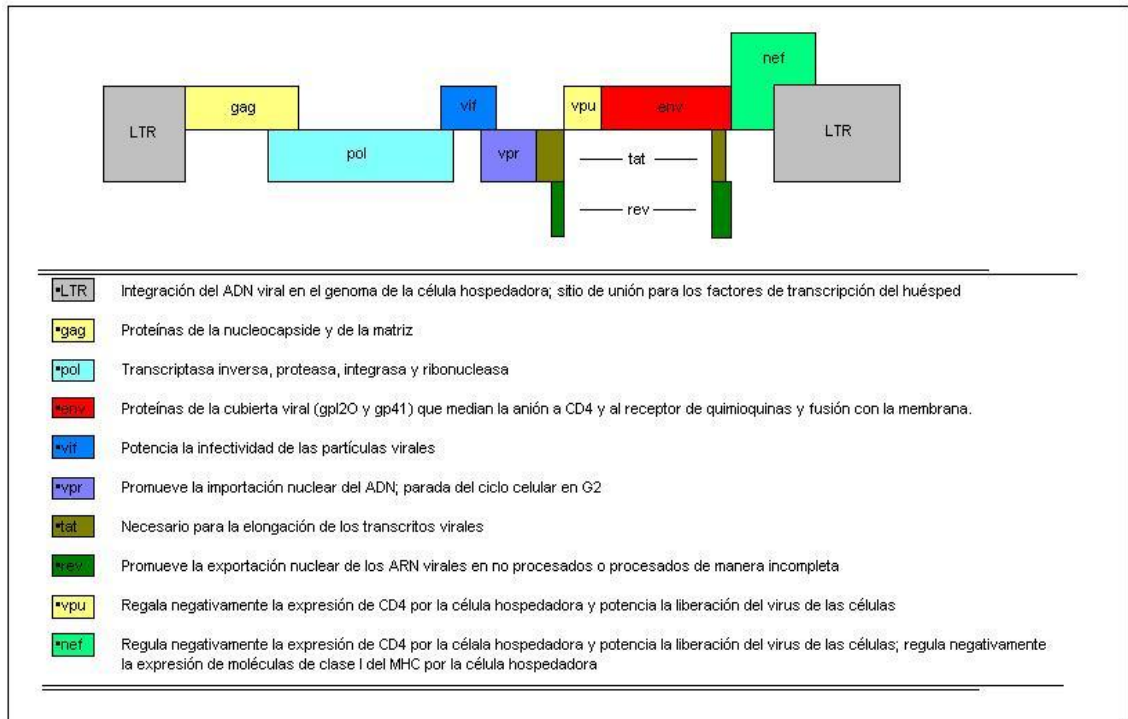
Figura 1. Estructura del VIH-1



*Adaptado (69)

El genoma del VIH comparte la disposición básica de secuencias de ácidos nucleicos característica de todos los retrovirus conocidos (Figura 2.). Las repeticiones terminales largas (LTR, del inglés. long terminal repeats) situadas en cada extremo del genoma regulan la integración viral en el genoma del huésped, la expresión génica del virus y la replicación viral (1). Una vez que el virus del VIH infecta una célula, todo su complejo nucleoproteico se activa para comenzar su ciclo de replicación.

Figura 2. Genoma del VIH tipo 1.

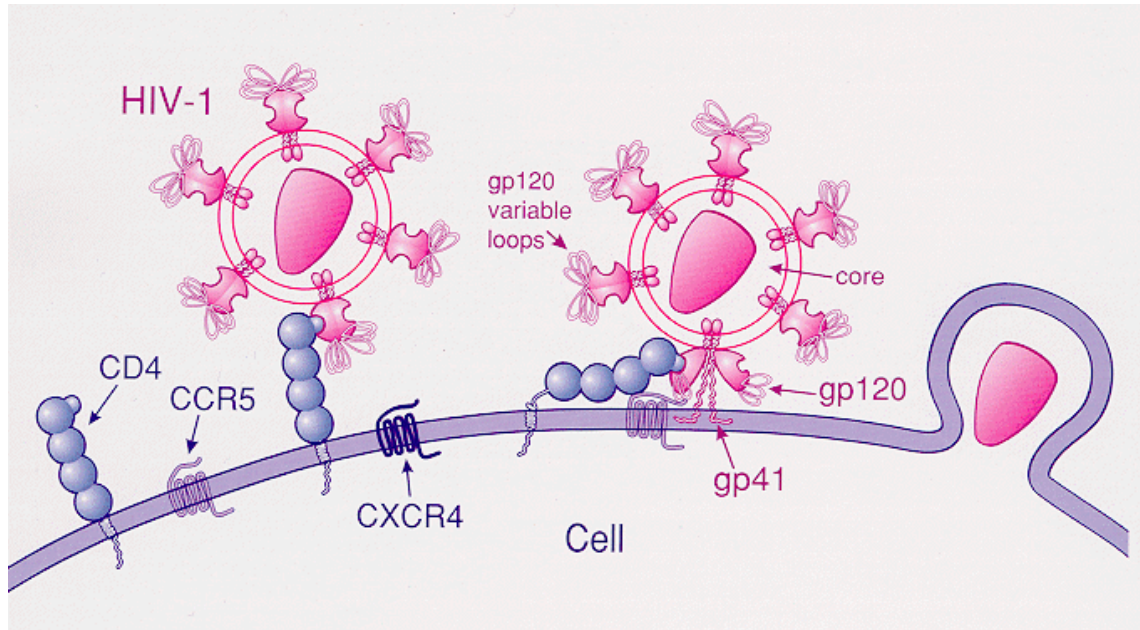


*Los bloques con diferente color indican las posiciones de los genes a lo largo del genoma lineal. Algunos genes utilizan algunas de las mismas secuencias que usan otros genes, tal como se muestra en los bloques que se solapan, pero son leídos de forma distinta por la ARN polimerasa de la célula hospedadora. Los bloques con color similar separados por líneas indican los genes cuyas secuencias codificadoras se encuentran separados en el genoma y requieren del procesamiento del ARN para producir un ARN mensajero (ARNm) funcional. Adaptado (36).

4.4 Aspectos inmuno-moleculares de la infección por VIH

Las células CD4 son una fuente natural de protección del cuerpo humano contra todo tipo de infección. El VIH ataca, infecta y mata las células CD4 (Figura 3.). Con el transcurso del tiempo, el virus sigue produciendo nuevas copias de sí mismo, que continúan infectando al resto de las células CD4 y se replica con tal rapidez que el cuerpo no es capaz de continuar luchando contra la infección, lo que finalmente desemboca en el desarrollo de signos y síntomas de SIDA. La pérdida de células CD4 empieza a ser significativamente peligrosa cuando alcanza una caída mayor del 30% sobre el número absoluto (64, 1).

Figura 3. Mecanismo de penetración VIH a linfocitos CD4+.



*Se observa la unión del complejo gp160 (Complejo proteínico de superficie del VIH $gp120+gp41=gp160$ esta es la maquinaria de unión del virus a la célula hospedera), donde la gp120 se une a CD4 primero y luego se une a CCR5 ó a CXCR4 ambos receptores de citoquinas. Tomado de (79).

Se debe tener en cuenta que el VIH circulante en sangre está por debajo del 2% del total existente en todo el cuerpo; el resto está en los tejidos del cuerpo como linfa, bazo y cerebro. La mayor carga viral se encuentra en los nódulos linfáticos donde se concentra la mayor cantidad de linfocitos T, y donde se produce alta replicación viral. El virus se replica y va saliendo a la sangre (1).

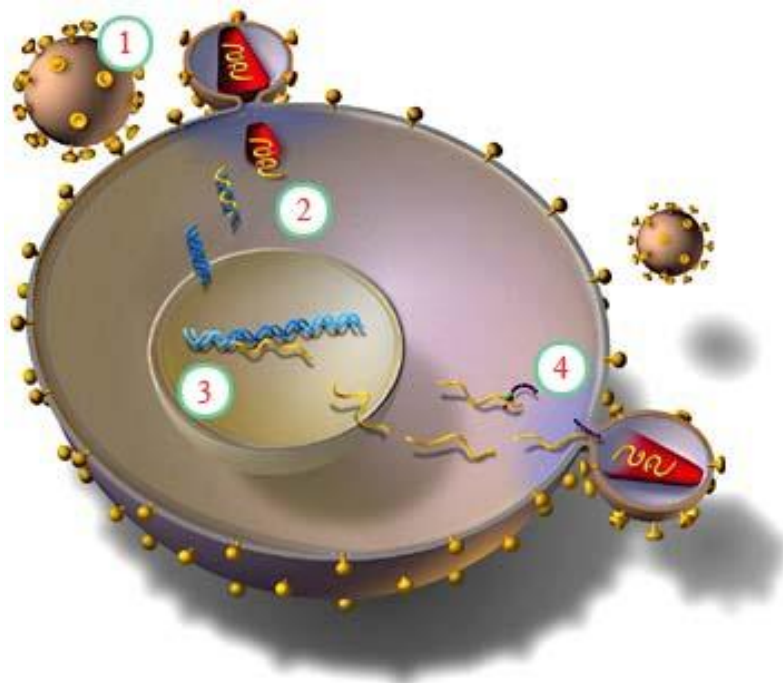
La patogénesis de la infección por VIH-1 se fundamenta en las complejas interacciones del virus con el sistema inmune del infectado. Este virus afecta diferentes células de la respuesta inmune, ya sea como consecuencia directa de la infección o, indirectamente, por múltiples mecanismos que incluyen, entre otros, la inducción de apoptosis mediada por varias proteínas virales solubles (Nef, Tat, Vpu, Vif), la muerte celular secundaria al estado de hiperactivación inmunológica inducido por esta infección, la formación de sincitios y el daño progresivo de los órganos linfoides primarios y secundarios (23, 64).

El VIH presenta diferencias notables respecto a la mayoría de las infecciones virales y bacterianas, en la etapa de viremia se produce una activación del sistema inmune desproporcionadamente extensa e inespecífica (de alto gasto energético). Que puede llegar a reducir considerablemente el número de virus, hasta casi un nivel de indetectable. Sin embargo, esta respuesta inmune no logra desarrollar mecanismos totalmente efectivos para controlar completamente la infección en la mayoría de los individuos infectados. Esto debido a la gran capacidad del virus para generar mutaciones en las secuencias antigénicas reconocidas por el sistema inmune adaptativo, generando cepas de escape (36, 62, 94). En consecuencia, a pesar de casi dos décadas de investigaciones dirigidas a inducir una respuesta inmune adaptativa contra el VIH-1, no se han implementado terapias inmunológicas o vacunas exitosas (64, 98, 59).

4.5 Ciclo de replicación del VIH-1

Un ciclo de replicación del VIH comprende 4 etapas principales, las cuales se muestran en el siguiente esquema (Figura 4). (64).

Figura 4. Ciclo de replicación del VIH (64).



- 1) Unión del virión a la célula, mediada por la interacción de la glucoproteína viral gp120 con el receptor (CD4) y un correceptor (los receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4, principalmente) presentes en las células blanco.
- 2) Fusión y entrada del virus que es mediada por la molécula gp41; liberación del genoma viral (ARN) y síntesis del ADN complementario por transcripción reversa, realizada por la transcriptasa reversa.
- 3) Transporte al núcleo del ADN viral e integración de éste en el genoma de la célula hospedera, paso en el que participan Vpr y la integrasa; transcripción del genoma proviral y procesamiento del ARN mensajero, con participación de la proteína viral Tat y factores de transcripción de la célula hospedera.
- 4) Exportación al citoplasma del ARN viral, mediado por la proteína Rev; producción de las proteínas en los ribosomas y procesamiento de ellas por la enzima viral proteasa; ensamblaje de los viriones y salida de ellos de la célula, paso en el cual adquieren la envoltura. Las proteínas accesorias también son indispensables para la replicación del virus; algunas de ellas son factores de virulencia críticos que han evolucionado para potenciar los efectos citopáticos del VIH-1.

4.6 VACUNAS SINTÉTICAS

4.6.1. Definición. Las vacunas sintéticas se definen como péptidos de origen artificial, los cuales representan segmentos proteicos de ciertos microorganismos y se utilizan como inmunizadores o vacunas para proteger de infecciones a seres humanos o a animales (16, 17, 74, 75).

4.7 ASPECTOS FÍSICOQUÍMICOS DE LAS VACUNAS SINTÉTICAS

Para que un péptido sintético induzca una memoria inmunitaria y sea buen candidato como vacuna, debe contener en su composición como mínimo dos epítopes (segmentos de péptido) diferentes: un epítipo de célula T y otro de célula B; es decir, un epítipo que pueda ser exhibido por las Células Presentadoras de Antígeno (APC o Macrófagos) y un epítipo que genere una respuesta inmune

humoral (generación de anticuerpos específicos) contra una estructura proteica tridimensional bien definida (75, 82).

Además, es requisito que ambos epítopes, B y T, sean reconocidos como extraños por las células inmunológicas para lograr desencadenar un proceso de “memoria inmunitaria”. Para que se cumpla dicha condición de “extrañeza”, la secuencia del péptido debe tener poca o ninguna homología con las secuencias proteicas de los tejidos del individuo que va a ser inmunizado (1, 7). Otra condición que debe tener el péptido sintético es poseer una distribución de residuos con carga eléctrica o momentos dipolares cuya fuerza coulombica total (sumatoria de fuerzas coulombicas de todos los residuos), supere un cierto valor umbral de acoplamiento entre el péptido y los anticuerpos dirigidos contra él. Si este umbral no es superado, entonces no ocurre acoplamiento del péptido con el receptor de célula B (célula productora de anticuerpos) y no se produce la activación de dichas células (68).

Existe un problema bastante extendido entre los microorganismos patógenos contra los cuales se han intentado hacer vacunas y no se han logrado, y es que al vacunar a las personas con las proteínas de superficie de éstos microorganismos, el organismo humano no las puede detectar debido a que son débilmente antigénicas, lo cual indica que tienen una fuerza coulombica total o resultante muy baja en su superficie, por lo cual no alcanzan a activar ninguna respuesta inmunitaria en la persona vacunada (8, 68).

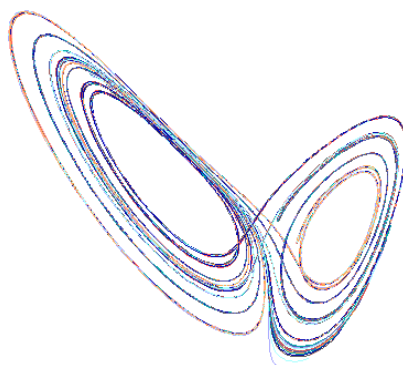
El polimorfismo es el principal mecanismo de defensa que poseen estos para evadir las respuestas inmunitarias (27), de modo que el uso de péptidos sintéticos que representen estructuras proteicas variables e hipervariables de estos agentes patógenos es poco eficaz en su papel de proteger al individuo vacunado, debido a que los anticuerpos generados con estos antígenos presentan poca o ninguna reactividad cruzada con las proteínas naturales del patógeno (7). Una posible solución a éste problema es sintetizar las vacunas con las regiones “constantes” de tales proteínas, no obstante estas regiones presentan otro inconveniente, consistente en que la mayoría de regiones constantes de las proteínas de cubierta de todos los microorganismos infecciosos son poco o nada inmunogénicas. La estrategia que se emplea para convertirlas en inmunogénicas al hacerlas sintéticamente, es sustituyendo uno o varios de sus residuos de aminoácidos, lo cual se hace mediante un proceso de química combinatoria (QC) sintetizando diversos repertorios de un mismo péptido (42).

4.8 PAPEL DE LAS PROTEÍNAS DE CUBIERTA DEL VIRUS DEL VIH PARA LA ELABORACIÓN DE UNA POSIBLE VACUNA

Las proteínas de cubierta de los microorganismos patógenos desempeñan un papel crucial en el proceso infeccioso de las células del hospedero, ya que de ellas depende la adhesión del virus a la célula y los procesos catalíticos subsiguientes para penetrar e infectarla (20).

Dentro del contexto de la Teoría del Caos, tales proteínas de cubierta pueden ser tratadas como sistemas dinámicos, complejos y caóticos (39). Pudiéndose describir su comportamiento mediante atractores extraños (Figura 5.) (61). Se consideran sistemas dinámicos porque en cada replicación del microorganismo estas proteínas hacen polimorfismo, modificando sus propiedades tanto antigénicas como adhesivas, es decir estos sistemas evolucionan a otro estado conformacional con respecto al tiempo (donde el tiempo es la variable independiente). Se consideran sistemas Complejos porque su estructura tridimensional y sus propiedades físicas y químicas dependen simultáneamente de múltiples factores: cargas eléctricas, polaridad, puentes de hidrógeno, enlaces disulfuro, fuerzas de Van Der Waalls, secuencia de la proteína, funcionalidad de la proteína, etc (49, 100), además poseen un gran número de elementos interactuantes y con interacciones no lineales, que muestran propiedades globales emergentes muy diferentes a las mostradas por sus componentes elementales y se consideran sistemas caóticos porque el polimorfismo que realizan es impredecible, aleatorio, es decir, caótico (49).

Figura 5. Atractor Extraño de Lorentz



*Tomado de (61)

Cuando el genoma viral se replica introduce errores de copia en “cualquier posición” de modo que en este sentido todos y cada uno de los puntos en el genoma tiene igual probabilidad de estar sometidos a polimorfismo. Por lo tanto, la alta tasa de replicación del virus en el organismo, unido a los mecanismos de evasión de la respuesta inmune mediante mecanismos de polimorfismo de proteínas y baja inmunogenicidad, ha ocasionado que todos los intentos para obtener una vacuna eficaz contra el virus hayan fracasado (101).

Las vacunas que estimulan la producción de anticuerpos protectores han resultado adecuadas para combatir enfermedades como la poliomielitis, el sarampión y la gripe. Por el mismo método los candidatos a vacuna anti-VIH que más se han probado hasta ahora utilizan partes de la proteína de la envoltura (Env), la molécula que tapiza superficie del virus. Puesto que el virus utiliza la proteína Env como una especie de llave para conseguir entrar en las células humanas (modelo llave-cerradura), generar anticuerpos que se fijen al extremo funcional de esta proteína debiera impedir que el VIH se acople con las células y las infecte (23, 101).

La proteína Env, también llamada gp160, es en realidad una asociación de dos unidades: gp120, una proteína revestida de azúcares que sobresale de la membrana del virus e interactúa con receptores de la superficie de los linfocitos T humanos, y gp 41, la pequeña proteína que ancla la gp120 a la membrana. Ambas proteínas se han utilizado como candidatas a una vacuna anti-VIH en pruebas realizadas con voluntarios humanos (20, 72, 56).

Las proteínas empleadas desencadenaron la producción de anticuerpos en las pruebas, resultado que hizo crecer las esperanzas de que pudieran formar la base de una vacuna efectiva contra el VIH. Los anticuerpos resultantes neutralizaron de forma efectiva a los virus vivos contenidos en los tubos de ensayo, bloqueando su capacidad de infectar linfocitos humanos cultivados. Por desgracia, los anticuerpos obtenidos de estos ensayos no reconocieron más que a las cepas de VIH que eran idénticas a las utilizadas para producir las vacunas. Estos anticuerpos fueron ineficaces a la hora de neutralizar las cepas de VIH obtenidas directamente de los pacientes infectados que eran perfectamente capaces de infectar otros cultivos de células (59, 86).

Los anteriores resultados son consecuencia de uno de los principales mecanismos de evasión o escape del virus VIH denominado polimorfismo antigénico o polimorfismo de secuencias proteicas (Tabla 1.).

Tabla 1. Ejemplo de Secuencias Polimórficas de Aminoácidos de la región V3 de la Proteína gp120 del VIH.

	1	1111111112	2222222223	3333333334	4444444445	5555555556	6666666667	7
	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1234567890	1
NA3	TIIVQLKEPV	KINCTRPNNN	TRKSINIG--	-PGRIFYATG	DIIGDIRQAH	CNVSLAEWNK	TLTKIVAKLR	E
NA40NKS.	E.....M.....T.....N.....	..I.KKD..N	..KQ..G...	
NA44T.S.	D.H.....T.....I.RTK..D	..RQ..S....	
NA26NDT.	D.H.....	..Q..H....T.E	-V.....	..L.M.K..N	S.KQTAS...	
NA36NHT.	D.H.....	..Q..R....S..HT..I.R.K.RD	..RHVAS...	
NA33NDTIS..	..G..H....	..G..T....	..T.....	..I.R...S	..GQ.ARQ..	
NA35AI	Q.....H....	..K..T....I.R...A	..KQ..K....	
NA1H.N.S.	E.....R.....VL....I.S...N	..RQV.D...	
NA51N.SI	V.....G..R..P...T.-I.R.K..N	..KQV...K	
NA28H.N.SI	Q.....	..R..PM...TI.G...K.	..Y..AN...K	
NA14	I.....NQSI	E.H.....	..R..PM...F....Y.Y	..L.R.K.VT	S.KQV.S...S	
NA23NKSI	D.Y.....	..Q..P....	..K..T....	A.....	..L.GE..G.	A.KQV.G....	
NA11T.AI	D.....	..Q..T....R.RLGD	..QQ.AK...	
NA37NDSI	D.....T..	..Q..VP....	H.....	..L.ITQ..N	..RH.AK..I	
NA30	P.....NKSI	A.H..T...	..QG.H....HS...HL.G...KN	..RQVAI..G	
NA47NDSI	E.....P....Y....L.R...N	..QQ.AI...	
NA7	..T...T.AI	E..I.....	..EG.HF...	..G..TA..	Q.....	..TI.S.K..N	..KQ..K...	
NA20N.SI	I.....H..	..EG.H....AE	Q.V.....	..L.YEQ..N	..KQV.D...	
NA52I	E.....H....TA..	E.....	..L.R.T..N	..KQ..R...	
NA25	V.....I	E.....	..E..PM...F....	..V.....	..I.G.R..N	..KQ..KR..G	
NA21Q..H...Q..H....	..L..L....I.G.Q..N	..KQV.N..K	
NA27T.A.	EVH.....	..QG.H....H.A.	E.....E..	..I.RT..N	..S...R..K	
NA8NAS.	E.....	..R..S....T....	E.....	..I.E.K.EN	..RQ.AK...	
NA45D.S.	E.....	..G.H....T....-I.K.K.EN	A.EQ.AK...	
NA18	I.....NKT.	E.....	..R.....L.K...DG	..KQ.AI...	
NA39N.SI	V.....H....R..	..I.RTK..N	..EQ.TK...	
NA13	V.....N.S.	V.H.....	..QG.R....VH...	R.....	..I.R.D..N	..RQ.AI...	
NA16	V...H.N.A.	A.T...S..D....P....	E.....	..I.RKD..N	..E..AT...	
NA24	V...H.N.S.	E.....L..I	..R..HV.HV	G...I.T..	-...K....	..I.R.K..N	..KQ..T...	
NA22	I...H.N.S.	E.....	..QG.HL...G...R	S.....	..L.SVK..D	..GQ..K...	
NA6N.TI	E.....	..EG.H....I.S.K..V	..KQ..T..G	
NA10NGSI	A.D.....	..E..P....T....	G.....	..I.R.K..G	..KQ..S..G	
NA34	M.....N.SI	EMD.....	..E..H....K....Y	..INRTK.QA	..KQ..T...	
NA15	A.....SQS.	..D.....	..EG.H....T....M....	..L.R...TG	..KQ..I..S	
NA32N.SI	A.E.A.....	..R..H....K..H...	EV.....	..INRTG..G	A.A...K...	

*M

uestras secuenciadas de la región V3 de la proteína de cubierta del VIH-1. Los aminoácidos idénticos entre secuencias están representados por puntos; se introducen guiones para alinear las secuencias cuando una de ellas presenta delecciones. Tomado de (90)

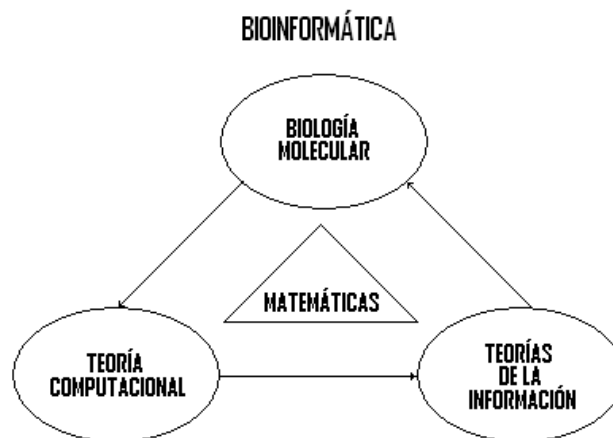
Entonces es de esperarse que una posible vacuna anti VIH, posea características especiales, en la cual esta active las rutas inmunológicas que produzcan anticuerpos capaces de neutralizar y evitar la progresión de la infección en humanos. Ninguna de las vacunas diseñadas por las diferentes metodologías hasta la fecha ha logrado ser eficiente en la prevención, curación o progresión de la infección (7, 20, 59).

4.9 HERRAMIENTAS COMPUTACIONALES

Existen numerosas herramientas computacionales, tanto en software como hardware, que permiten modelar y procesar datos de muchos problemas complejos de la biología, a estas herramientas computacionales (en particular al software) se le conoce como herramientas bioinformáticas.

4.9.1. Bioinformática. Es una disciplina que se apoya en la biología molecular, teoría computacional y teorías de la información, integradas estas a su vez por las matemáticas, para generar un gran despliegue de herramientas computacionales de uso en experimentación biológica (Figura 7.) (38).

Figura 7. Bioinformática



*Tomado de (38)

Los investigadores se apoyan en herramientas computacionales que les permitan enfrentarse a muchos problemas que surgen en los laboratorios generando así, un nuevo tipo de estudio de la biología. “*La biología in silico*¹”, este tipo de estudios jamás remplazarán los estudios hechos en laboratorio pero si permiten generar un amplio impacto en la generación de conocimiento por la aplicación de estas

¹ Término utilizado para marcar la diferencia entre la investigación biológica en laboratorio (biología en húmedo) y la investigación biológica que se realiza mediante técnicas computacionales.

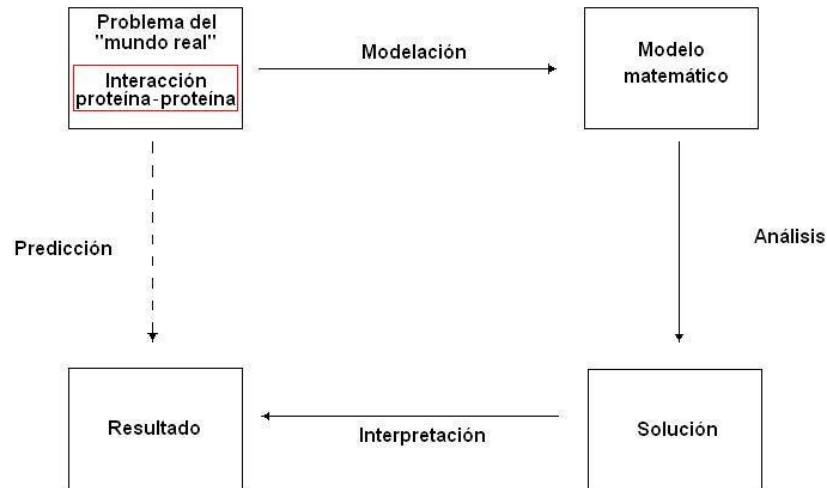
técnicas (38). La modelación es uno de los principales procesos que se pueden llevar a cabo para enfrentar un problema biológico complejo, debido a la naturaleza ya descrita del VIH, esta es una excelente alternativa para enfrentarse al problema.

4.10 HERRAMIENTAS DE MODELADO

4.10.1. ¿Qué es modelado?: Cuando se habla de modelación ó modelamiento, se hace referencia al proceso por el cual se puede reconstruir un proceso biológico, natural y complejo a nivel molecular, a una forma llamada modelo, el cual puede analizarse por técnicas conocidas, que están probadas, que son validadas y confiables. En otras palabras, un modelo es un dispositivo que ayuda al modelador a predecir o explicar el comportamiento de un fenómeno, experimento o proceso, en este caso, las intrincadas interacciones que suceden entre proteínas (8, 13).

No existe un modelo perfecto que describa el comportamiento absoluto de un fenómeno en todas sus posibilidades de evolución, pero si es posible acercarse con una buena precisión al fenómeno real, esto, dependiendo de la calidad del modelo obtenido. Para elaborar un modelo se debe contar con por lo menos un conjunto de leyes naturales aplicables estudiadas que permitan la construcción de un modelo matemático del problema (Figura 8.). Luego de esto se pueden usar las ecuaciones, restricciones y elementos de control del modelo para dar una descripción razonablemente precisa de los elementos que confluyen sobre el fenómeno modelado. A los fenómenos moleculares se les otorga expresiones matemáticas mediante un modelo general, para tratar de que todos los resultados posibles queden descritos por unos principios básicos, es decir que a un problema específico, por ejemplo: el problema de las interacciones tipo proteína-proteína, se lo puede traducir a un problema matemático concreto por medio de un modelo, en el que se tratara de resolver el problema matemático, esto por medio de una simulación de computadora, para luego interpretar el resultado en el entorno natural del problema (13). En la actualidad existe una enorme disponibilidad de algoritmos que permiten modelar este tipo de problemas, de hecho existen poderosos paquetes de software que los incorporan y permiten la modelación del problema y la solución del sistema de ecuaciones que lo describe.

Figura 8. Solución de un problema de interacción proteína-proteína por medio de modelamiento matemático.



*Adaptado de (13).

4.11 CLASIFICACIÓN DEL PROBLEMA DE MODELADO

4.11.1. Clasificación del problema como un sistema dinámico. A temperatura ambiente, un sistema molecular no es estático sino que atraviesa múltiples mínimos de la superficie de energía potencial (63). Cada átomo puede ser considerado como una partícula cuyo movimiento está determinado por las fuerzas que sobre ella ejercen todos los otros átomos de su entorno, según prescribe la física newtoniana ($F = m \cdot a$). Dadas las posiciones y velocidades de las partículas, así como la magnitud y dirección de las fuerzas que actúan sobre cada una de ellas en un instante determinado, por integración de las ecuaciones del movimiento de la mecánica clásica se pueden obtener la posición y la velocidad en un instante ligeramente posterior. Tomando pasos de tiempo sucesivos se puede construir una trayectoria dependiente del tiempo para todos los átomos, que representará así el movimiento de los mismos. Dadas estas consideraciones claramente el sistema molecular evaluado es un sistema dinámico (8, 13).

4.11.2. ¿Por qué es un sistema dinámico?. Todo sistema en el cual un proceso evoluciona con el tiempo y al tiempo puede considerarse, casi siempre, como la variable independiente, puede ser considerado como un sistema dinámico.

Todo modelo de un sistema dinámico posee a su vez ciertos elementos que lo definen como tal (13):

- **Variables naturales:** Un proceso natural se describe mediante un conjunto de variables denominadas variables naturales las cuales dependen de una sola variable independiente. Para nuestro problema del tipo interacción proteína-proteína, el tiempo t es la variable independiente; las variables naturales son consideradas a nivel termodinámico, por ejemplo, la temperatura, T , la presión, P , y el número de partículas, N .
- **Leyes Naturales:** Un proceso natural se desenvuelve con el tiempo de acuerdo con las leyes o principios naturales en los que intervienen variables del mismo tipo. A veces estas leyes surgen de manera empírica; a veces tienen un significado intrínseco, como en nuestro caso, el de la segunda ley de Newton o ley del movimiento (esto se verá con mas detalle mas adelante). Una notación apropiada permite dar una estructura matemática a las variables y leyes naturales.
- **Parámetros naturales:** Las leyes naturales a menudo incluyen parámetros que deben determinarse en forma experimental; por ejemplo: las posiciones iniciales de átomos de proteínas provenientes de estructuras experimentales, tales como las obtenidas a partir de cristales, por difracción de rayos X, o en disolución, por espectroscopia de RMN.

Matemáticamente el modelado de un sistema dinámico se define por sus variables de estado.

4.11.3. Variables de estado. Son variables naturales cuyos valores en un instante, junto con las leyes naturales del proceso, determinan únicamente valores de estas variables para aquellos valores donde se apliquen las leyes. Un proceso natural (o su representación matemática) descrito por las variables de estado es un sistema dinámico. Se dice que los valores de las variables de estado describen en cualquier instante el estado del sistema dinámico (13).

Por ejemplo, la posición y velocidad son variables de estado para el sistema dinámico de un cuerpo que se mueve verticalmente. El enfoque de los sistemas dinámicos para la modelación, en el que de algún modo interviene la evolución del

estado del sistema a través del tiempo, es un concepto moderno en su ámbito, pero de alguna forma ha existido durante siglos.

El objeto de esta investigación puede clasificarse como un problema de ingeniería de proteínas sintéticas, modelable con dinámica molecular (35).

4.12 DINÁMICA MOLECULAR CLÁSICA

La Dinámica Molecular (DM) clásica² (algunos autores la mencionan como mecánica molecular), es una técnica de simulación computacional para estudiar las propiedades de sistemas de muchas partículas tanto en equilibrio como fuera de equilibrio. La evolución temporal del sistema de partículas, que interactúan mediante cierto potencial, se calcula por integración numérica de las ecuaciones de movimiento. Es una excelente aproximación para muchos materiales. A excepción de elementos ligeros donde es necesario tomar en cuenta los efectos cuánticos.

El primer reporte del uso de DM fue presentado por Alder y Wainwright en 1959 (5), DM se usa para estudiar las propiedades de diferentes fluidos con estructura rígida, a partir 1964 DM se usa en el estudio de sistemas moleculares más realistas, en las cuales los átomos interactúan mediante potenciales de tipo Lennard-Jones y más complejos. (35)

Después de este punto, la técnica de DM se desarrolla rápidamente abarcando especies diatómicas, como el agua (el cual sigue como sujeto de las investigaciones hasta la actualidad), pequeñas moléculas rígidas, hidrocarburos flexibles y ahora incluso macromoléculas como las proteínas y el ADN (8).

Las simulaciones de dinámica molecular, han contribuido en el estudio de los complejos procesos que sufren las proteínas, como: cambios en su conformación, plegamiento y estabilidad, así como también han permitido elaborar modelos de interacción tipo proteína-proteína, proteína-DNA, etc. En la actualidad se han convertido en un poderoso soporte complementario para dilucidar estructuras a partir de datos experimentales obtenidos por RMN y difracción de rayos X, además de ser una de las principales herramientas en la búsqueda de nuevos fármacos y en la ingeniería de proteínas (35, 40).

² En dinámica molecular clásica las partículas se rigen por las ecuaciones de Newton del movimiento para determinar cómo el sistema evoluciona a lo largo del tiempo.

4.13 FUNDAMENTOS DE DINÁMICA MOLECULAR

La formulación de la DM sin la mecánica estadística sería imposible, ya que sobre ella descansa la base teórica que permite la conversión de información del sistema de nivel microscópico (posiciones atómicas y velocidades) a nivel macroscópico (presión, energía, capacidad calórica, cambios de energía libre, etc.), es decir, que la mecánica estadística aporta la rigurosidad matemática que permite relacionar el sistema en estos dos niveles y la DM aporta los medios para la solución de las ecuaciones del movimiento y su evaluación (35).

Algunas de las aplicaciones potenciales de las simulaciones con DM, en macromoléculas de interés biológico son:

- En ingeniería de proteínas, para determinar la dinámica evolutiva el sistema creado.
- Obtención de estados termodinámicos del sistema.
- Refinamiento de estructuras de macromoléculas obtenidas de experimentos de difracción de rayos X o espectroscopia de RMN.

4.14 INTRODUCCIÓN AL MÉTODO DE SIMULACIÓN POR DM

En dinámica molecular el estado termodinámico del sistema se define según unos pocos parámetros, es decir: su temperatura, T , presión, P , volumen, V , y número de partículas, N . Otras propiedades de pueden derivar de las ecuaciones de estado. El estado mecánico o microscópico de un sistema está definido por las posiciones atómicas, q , y los momentos, p (35). Si ubicamos N numero de partículas con q posiciones en un sistema de coordenadas 3-dimencional tendríamos para cada posición (q_x, q_y, q_z) es decir, una posición vectorial tiempo-dependiente $q_i(t)$, cada una de estas posiciones $q_i(t)$, tiene asociado un momento $p_i(t)$, lo cual convierte el sistema en un espacio multidimensional llamado “espacio de fase”. Por lo tanto, este espacio tiene $6N$ dimensiones (37, 40).

Las bases estadísticas de la termodinámica, permiten definir ciertas configuraciones del sistema en el espacio de fase que satisfacen las condiciones de un estado termodinámico determinado. A estas configuraciones se les conoce como colectivo o emsemble (78).

Una simulación de DM genera una secuencia de configuraciones en el espacio de fase que está concatenada en función del tiempo, recibe el nombre de trayectoria. Cada punto separado en el tiempo de la trayectoria equivale a un instante diferente al anterior, como si fuera una foto instantánea que registra la trayectoria evolutiva del sistema. Todos los puntos de la trayectoria pertenecen al mismo colectivo y corresponden a diferentes configuraciones y momentos del sistema. Aunque cada estado microscópico sea diferente, el estado macroscópico o termodinámico del sistema es idéntico (35).

Existen diferentes colectivos con diferentes características (35, 37, 78):

- Colectivo microcanónico (NVE): El estado termodinámico se caracteriza por un número fijo de átomos, N, un volumen fijo, V, y una energía fija, E. Esto corresponde a un estado aislado.
- Colectivo canónico (NVT): Esta es una colección de todos los sistemas cuyo estado termodinámico se caracteriza por un número fijo de átomos, N, un volumen fijo, V, y una temperatura fija, T.
- Colectivo gran canónico (mVT): El estado termodinámico caracterizado por un potencial químico fijo, m, un volumen fijo, V, y una temperatura fija, T.

En una simulación de DM, para poder trazar la trayectoria de la dinámica del comportamiento en el espacio de fase, se debe hacer uso de la mecánica estadística, esta permite tomar de todas las replicas del sistema consideradas simultáneamente los promedios del colectivo en uso (35). Este promedio se define por:

$$\langle A \rangle_{\text{colectivo}} = \iint d p^N d r^N A(p^N, r^N) p(p^N, r^N)$$

Donde la observable de interés es $A(p^N, r^N)$, esta se expresa en función de los momentos, p, y las posiciones, r, del sistema. La integración se debe realizar sobre todas las posibles variables de r y p.

La función de densidad de probabilidad del colectivo $p(p^N, r^N)$, se debe definir como (35, 40):

$$p(p^N, r^N) = \frac{1}{Q} \exp \left[-\frac{H(p^N, r^N)}{k_B T} \right]$$

Donde H es el Hamiltoniano, T es la temperatura, k_B es la constante de Boltzmann y Q es la función de partición. Donde Q , se define como (35):

$$Q = \iint d p^N, d r^N \exp \left[-\frac{H(p^N, r^N)}{k_B T} \right]$$

Esta ecuación integral no posee solución analítica, por lo tanto, se debe resolver numéricamente, de allí que sea extremadamente costosa en cantidad y tiempo de procesamiento, ya que es muy difícil de resolver. En una simulación de DM como la trayectoria de la simulación es secuencial, se deben calcular todos los estados posibles del sistema correspondientes a los condicionantes termodinámicos dados. Por lo tanto, en DM lo que se hace es determinar el promedio en el tiempo de A , que se expresa como (35):

$$\langle A \rangle_{\text{tiempo}} = \lim_{\tau \rightarrow \infty} \frac{1}{\tau} \int_{t=0}^{\tau} A(p^N(t), r^N(t)) dt \approx \frac{1}{M} \sum_{t=1}^M A(p^N, r^N)$$

Donde t es el tiempo de simulación, M es el número de pasos de tiempo en la simulación y $A(p^N, r^N)$ es el valor instantáneo de A (35). De esto se asume que las observables experimentales son promedios del colectivo en uso, por lo tanto, lo que se obtiene con una simulación de DM son promedios de evolución temporal. Esto permite que se pueda comparar los promedios del colectivo con el promedio temporal, esto conduce a la hipótesis ergódica de la mecánica estadística, que equipara al promedio temporal con el promedio del colectivo (35, 40):

$$\langle A \rangle_{\text{colectivo}} = \langle A \rangle_{\text{tiempo}}$$

La idea básica es que si se permite que el sistema evolucione a lo largo del tiempo de forma indefinida, ese sistema pasará eventualmente por todos los estados posibles. Una meta, por tanto, de una simulación de DM es la de generar suficientes conformaciones representativas de modo que se satisfaga esta igualdad. Si así sucede, se podrá entonces extraer información relevante experimentalmente al poderse calcular propiedades estructurales, dinámicas y termodinámicas utilizando los recursos computacionales al alcance. Como la duración de la simulación es necesariamente limitada, debe asegurarse de que se muestrea una cantidad suficiente del espacio de fase, lo cual suele resultar computacionalmente caro al consumir mucho tiempo de cálculo (35).

4.15 MECÁNICA CLÁSICA

La interpretación Newtoniana de la dinámica del movimiento se da de su segunda ley. Donde la translación dinámica de un átomo i es causada por una fuerza F_i que actúa como agente externo,

$$F_i = m\ddot{r}_i$$

Donde m es la masa de la molécula, donde se asume la independencia de la posición, velocidad y tiempo. La aceleración esta dada por,

$$\ddot{r}_i = \frac{d^2 r_i}{dt^2}$$

Donde r_i es un vector de posición, que lo ubica en un sistema de coordenadas 3-dimensional (40). Haciendo la relación a dinámica hamiltoniana obtendremos,

$$-\frac{\partial U}{\partial r_i} = F_i = m_i \ddot{r}_i = m_i \frac{d^2 r_i}{dt^2}$$

Donde F_i es la fuerza ejercida sobre la partícula, m_i es su masa, \ddot{r}_i es la aceleración y U es la energía potencial. Al conocer F_i sobre cada átomo (i) es posible determinar la aceleración de cada átomo del sistema. Al integrar las ecuaciones del movimiento se obtiene las trayectorias que describen las posiciones, velocidades y aceleraciones de los átomos en el tiempo. Por lo tanto, a

partir de estas trayectorias se pueden determinar los valores promedios de las propiedades del sistema (40, 78).

El método es determinista, ya que una vez que se saben las posiciones y las velocidades de cada átomo se puede predecir el estado del sistema a cualquier tiempo del futuro o del pasado. Igualmente, las posiciones y velocidades a tiempo cero determinan las posiciones y velocidades a todos los otros tiempos (35).

Para calcular una trayectoria, todo lo que se necesita son las posiciones iniciales de los átomos, una distribución inicial de las velocidades, y las aceleraciones, que se determinan por el gradiente de la función de energía potencial (ecuación del movimiento de Newton). Como posiciones iniciales se pueden utilizar las provenientes de estructuras experimentales, tales como las obtenidas a partir de cristales, por difracción de rayos X, o en disolución, por espectroscopia de RMN. Las velocidades iniciales se asignan generalmente a partir de una distribución al azar, con magnitudes ajustadas a la temperatura seleccionada y corregidas de modo que el momento global sea cero (35),

$$P = \sum_{i=1}^N m_i v_i = 0$$

Ya que el total de la energía es separable, el equilibrio distribución de velocidades obedece a la ley de Maxwell-Boltzmann, es decir, que la energía cinética es independiente de las posiciones atómicas y la energía potencial es independiente del momento atómico. Esto de la forma,

$$N(p) = \int N(r, p) dr = \frac{N}{C} \exp\left(-\frac{p^2}{2mkT}\right)$$

Donde k es la constante de Boltzmann y C es la constante que garantiza que la normalización se satisface (78). Entonces, para obtener la probabilidad de que un átomo i tenga una velocidad v en la dirección x a una temperatura T se usa,

$$p(v_{ix}) = \sqrt{\frac{m_i}{2\pi k_B T}} \exp\left[-\frac{m_i v_{ix}^2}{2k_B T}\right]$$

La temperatura se puede calcular a partir de las velocidades utilizando la relación:

$$T = \frac{1}{(3N)} \sum_{i=1}^N \frac{|p_i|^2}{2m_i}$$

Donde N es el número de átomos del sistema (35, 40, 37).

La energía potencial U , es función de las posiciones atómicas ($3N$) de todos los átomos del sistema. Dada la naturaleza compleja de esta función, no hay una solución analítica a las ecuaciones del movimiento, por lo que deben resolverse numéricamente (35).

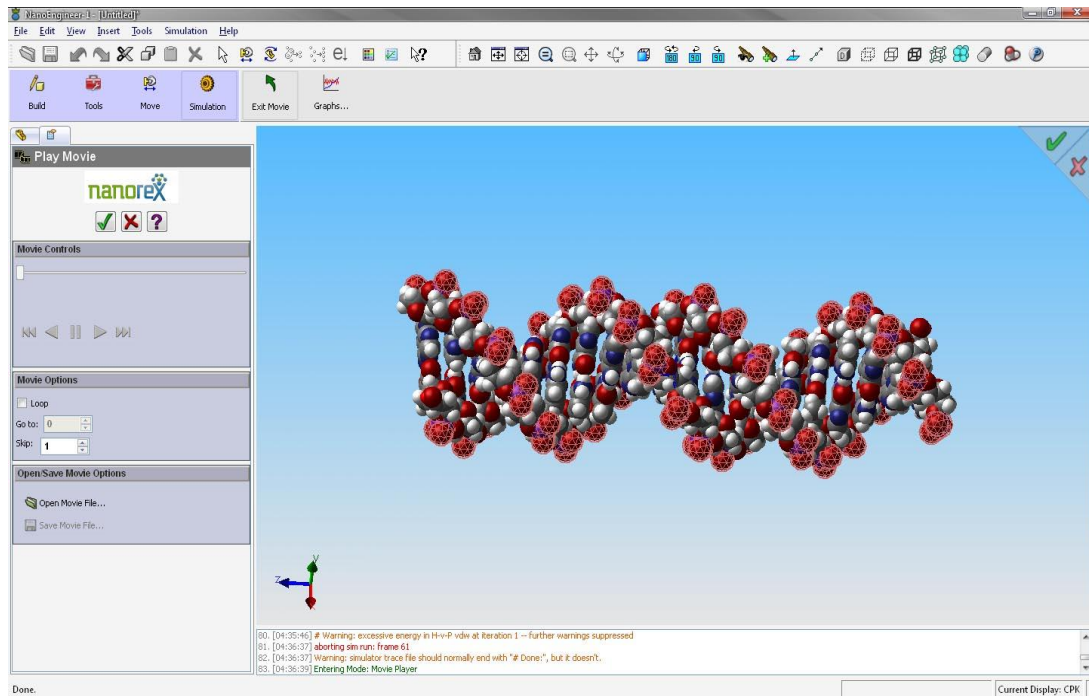
4.16 FUNCIONES DE ENERGÍA POTENCIAL

El gran número de átomos que contienen las macromoléculas biológicas no permiten aun, el abordaje de su físico-química a un nivel cuántico, este solo es posible realizarlo a la fecha a sistemas reducidos con muy pocos átomos, por ejemplo, reacciones catalizadas por enzimas, ruptura de enlaces covalentes. Las macromoléculas biológicas solo son tratables computacionalmente cuando se recurre a funciones de energía potencial. Estas ofrecen un compromiso razonable entre eficiencia y precisión de cálculo numérico (8, 35, 97). Los campos de fuerzas se calibran tanto de datos de modelos teóricos físico-cuánticos, así como también de datos experimentales de diferentes espectroscopias, de pequeños compuestos modelo. Este es un campo de constante investigación donde muchos grupos de investigación invierten enormes esfuerzos, entre las funciones de energía potencial se encuentran los campos de fuerzas de CHARMM y CHARMM (Chemistry at HARvard Macromolecular Mechanics), GROMOS (GRONingen Molecular Simulation Package), AMBER (Assisted Model Building with Energy Refinement), CVFF (Consistent-Valence Force Field), GROMACS y OPLS (Optimized Potentials for Liquid Simulation)/AMBER (35, 67).

4.17 PAQUETES DE SOFTWARE DE MODELADO

4.17.1. NanoEngineer-1 (NE1)+ GROMACS+HDF5. Poderoso paquete de código abierto (GPL) para el diseño, modelado y simulación 3D multi-escala de nano-compuestos, con soporte especial para nanotecnología de DNA estructural y proteínas, por lo que incluye librerías de moléculas biológicas, aminoácidos y ácidos nucleicos. NE1 cuenta con una excelente interface grafica 3D de trabajo para el modelado CAD (Figura 9.), La cual está hecha para un uso fácil e interactivo del modelado y diseño, atómica y molecularmente preciso de la composición de nano-sistemas grandes. NE1 Cuenta con un poderoso motor de simulación de dinámica molecular integrado nativo del sistema, pero puede ejecutar otros motores de simulación de plataforma cruzada, que implementan otros algoritmos, como GROMACS+HDF5, el cual es una plataforma de simulación de dinámica molecular de rendimiento extremo de sistemas de centenares a millones de partículas, el (+HDF5) viene de la tecnología del formato de archivo HDF5 de almacenamiento masivo de datos experimentales. NE1 usa GROMACS+HDF5 como un sistema de minimización de energía y simulación de dinámica molecular. La fundamentación matemática de esto paquetes de software ya fueron mencionados en el Marco Teórico de éste documento. Otros sistemas de simulación que son soportados son los de simulación masivamente distribuidos y paralelizados, estos pueden usarse cuando se requiere cálculos muy demandantes de procesamiento. NE1 por ser código abierto pueden realizarse modificaciones al paquete lo que permite adecuarlo a necesidades particulares. NE1 posee además modularidad para instalación de plugins que permiten agregar funcionalidades extras al programa, como es el caso de POV-Ray este plugging permite renderizar las moléculas modeladas en NE1 y genera imágenes de alta definición con calidad de publicación, entre otros.

Figura 9. Interface grafica NanoEngineer-1



*Se muestra en la grafica un modelado estructural de una molécula de ADN de doble cadena antes de una simulación con dinámica molecular. (Captura de pantalla, modelado en NE1)

4.18 ARCHIVOS DE COORDENADAS MOLECULARES (*.PDB)

Para la realización de este trabajo fue muy importante el contar con modelos de coordenadas moleculares de las estructuras terciarias y cuaternarias que existen sobre cada una de las moléculas con las que va interactuar la vacuna sintética dentro del sistema inmune. Esta información se presenta en archivos de texto planos con extensión *.pdb de Brookhaven Protein Databank (PDB) y se les conoce como “archivos de coordenadas moleculares”. Los archivos de coordenadas moleculares contienen información precisa sobre la estructura tridimensional de una molécula. Las estructuras terciarias de estas moléculas, han sido dilucidadas por las técnicas de difracción de Rayos X y Resonancia Magnética Nuclear, y en algunos casos especiales se presentan archivos de coordenadas moleculares construidos mediante la aplicación de modelos matemáticos (2, 35). La gran mayoría de estos archivos con extensión *.pdb se encuentran alojados en bases de datos publicas de acceso gratuito en Internet como www.pdb.org

4.18.1. Líneas de un pdb. La información de un archivo PDB se encuentra distribuida en diferentes líneas ó encabezados que contienen propiedades particulares de la molécula, estas líneas son (Tabla 2.) (2).

Tabla 2. Líneas de archivo del formato *.pdb.

HEADER	Nombre y fecha de creación del archivo PDB.
COMPND	Nombre de la molécula.
SOURCE	Organismo del que se obtuvo la proteína.
AUTHOR	Lista de los Autores que proporcionaron la estructura molecular al PDB
REVDAT	Datos de revisión de la estructura de la proteína.
REMARK	Comentarios en relación a los artículos en donde se publicó la estructura molecular o sobre las características de la molécula.
SPRSDE	Lista de archivos de coordenadas para la misma estructura.
SEQRES	Secuencia de los aminoácidos de la proteína.
FTNOTE	Notas de pie de página. No todos los archivos lo tienen.
HET & FORMUL	Lista de cofactores, grupos prostéticos, inhibidores y otras sustancias no proteicas presentes.
HELIX, SHEET & TURN	Lista de los residuos con estructura secundaria en la proteína.
CRYST1, ORIG & SCALE	Información general sobre los cristales con los que se obtuvo la estructura por Rayos X
ATOM & HETATM	Contiene la información de la posición espacial en los ejes X, Y y Z de cada uno de los átomos, especificando el residuo y la cadena.
CONNECT	Enlaces formados entre los átomos no proteicos presentes en el PDB.
MASTER & END	Indican la finalización del archivo.

*Tomado de (2).

Las líneas ATOM son las líneas que contienen los datos de posición de cada átomo a nivel espacial (coordenadas X, Y y Z además de otros identificadores) y tienen la siguiente estructura (2):

ATOM 29	CA	PRO	A 5	-2.551	-37.351	4.539	1.00	0.00	1CLG 79
↓	↓	↓	↓	↓			↓	↓	↓
1	2	3	4	5			6	7	8

1) ATOM 29 es el número secuencial del átomo dentro del archivo en este caso átomo 29.

2) El tipo de átomo (CA):

N = Nitrógeno del grupo Amida

O = Oxígeno del grupo Carbonilo

CB = Carbono beta

CA = Carbono alpha

CB= carbono beta

CD= Carbono delta

3) Nombre del residuo, código de tres letras (PRO)

4) Número del residuo y cadena (A-5).

5) Coordenadas en angstrom del átomo en los ejes X, Y y Z de la celda unitaria. (-2.551 -37.351 4.539)

6) Ocupancia: Fracción de la celda unitaria que contiene el átomo en una ubicación particular. Usualmente este valor es de 1.00

7) Factor de temperatura: es un indicativo de la incertidumbre de la posición del átomo debido al desorden por las vibraciones térmicas. (0.00).

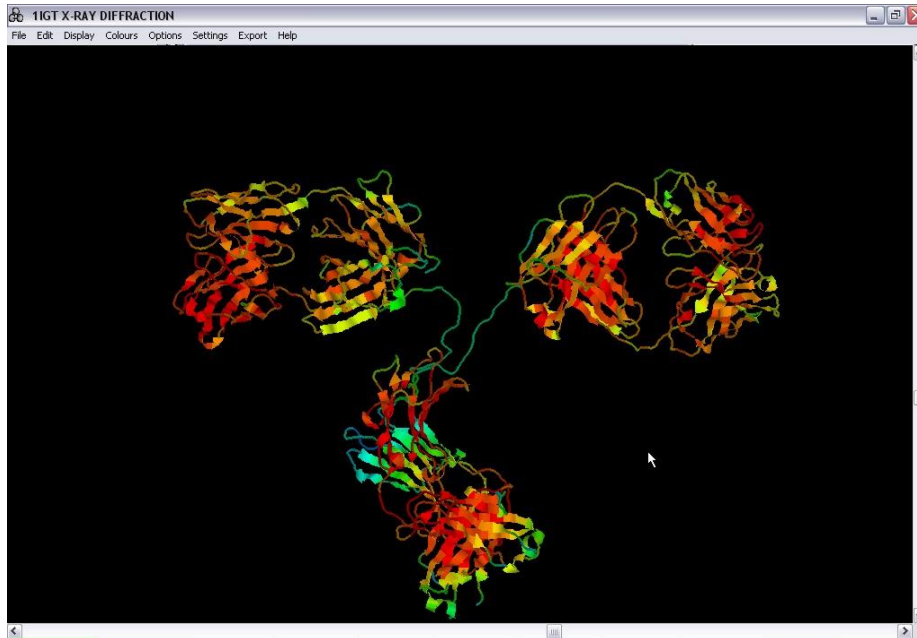
8) El código de identificación ID del archivo PDB (1CLG).

4.19 HERRAMIENTAS DE VISUALIZACIÓN DE ARCHIVOS *.PDB

Existen numerosos paquetes bioinformáticos para la visualización y tratamiento de datos de proteínas para los archivos *.pdb, a continuación se presentan los que se usaran para el tratamiento de datos de los archivos de coordenadas moleculares.

4.19.1. RasMol. Es un programa de gráficos moleculares que permite la visualización de proteínas (Figura 10.), ácidos nucleicos y moléculas pequeñas. Fue creado por Roger Sayle en 1992 bajo licencia GNU, lo cual ha permitido que numerosos programadores contribuyeran enriqueciendo el código fuente de RasMol ampliando por mucho su funcionalidad. Este programa está ideado para hacer posible la visualización, la enseñanza y la producción de imágenes con calidad de publicación. RasMol es compatible con los siguientes sistemas operativos y arquitecturas: Microsoft Windows, Apple Macintosh, sistemas UNIX Y VMS (10). El programa lee archivos de coordenadas moleculares y muestra interactivamente la molécula en la pantalla en una serie de esquemas de colores y de representaciones moleculares. Los archivos de entrada incluyen, específicamente, los formatos Brookhaven Protein Databank (PDB), Tripos Associates' Alchemy y Sybyl Mol2, Molecular Design Limited's (MDL) Mol, Minnesota Supercomputer Centre's (MSC), XYZ (XMol), CHARMM, formato CIF y archivos mmCIF. Si la información sobre conectividad no está contenida en el archivo, RasMol la calculará automáticamente. Actualmente las representaciones disponibles incluyen estructuras de alambre con profundidad (wireframe), bastones, esferas de espacio relleno (CPK), bolas y bastones, cintas biomoleculares (bien lisas, sólidas y sombreadas, bien alambres paralelos) etiquetas de átomos y superficies de puntos. Los átomos pueden ser también etiquetados con cualquier texto. Córfómeros alternativos y modelos NMR múltiples, pueden ser coloreados específicamente y etiquetados sus átomos. Diferentes partes de la molécula pueden representarse y colorearse independientemente del resto de la molécula o ser visualizados simultáneamente en diferentes formas. La molécula exhibida puede ser girada, desplazada, ampliada (zoom) y/o cortada en rebanadas interactivamente usando, bien el ratón, las barras de desplazamiento de Windows, o la línea de comandos de la caja de órdenes adjunta. RasMol puede leer una sucesión de comandos previamente preparada en un archivo de script (guión) (o vía comunicación interactiva) para permitir cargar una imagen dada o un punto de vista concreto, de forma rápida. RasMol también puede crear un archivo script conteniendo los comandos requeridos para regenerar una imagen en uso. Finalmente, la imagen generada podría exportarse en una variedad de formatos incluyendo GIF, PPM, BMP, PICT, archivos de salida Sun o como un script MolScript o Kinemage. (10)

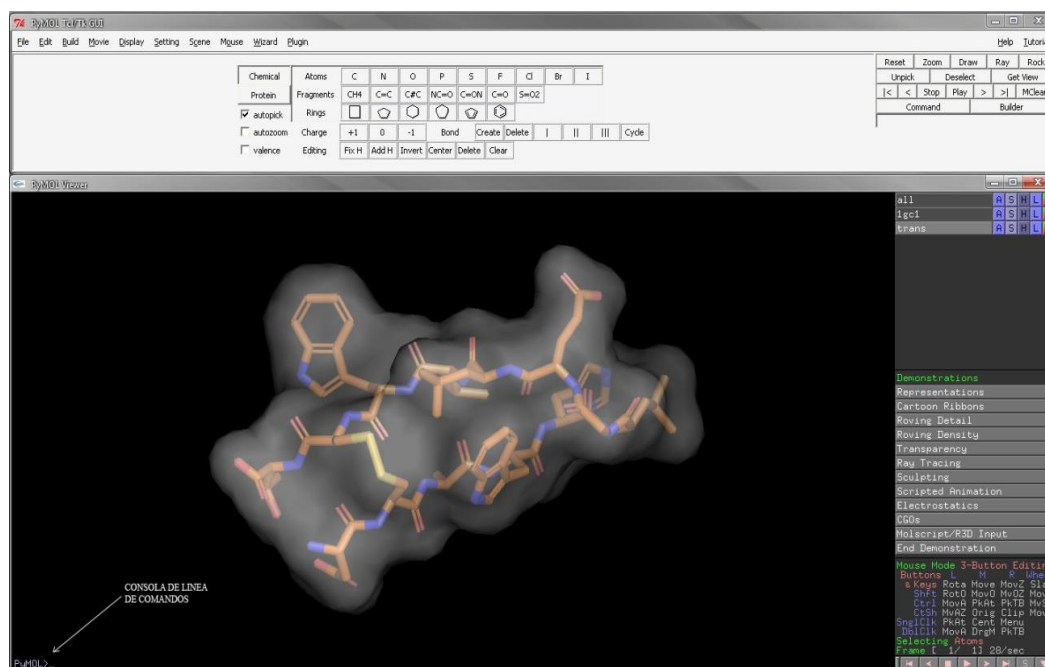
Figura 10. Interface grafica de RasMol



* Imagen de Una Inmunoglobulina G desplegada en RasMol ver 2.7.3 (Captura de pantalla).

4.19.2. PyMOL. Visualizador de gráficos moleculares, que permite la animación y edición de grafos de archivos de coordenadas moleculares de diferentes formatos, con calidad para publicaciones, este programa se ejecuta sobre una consola de Python por lo cual requiere que se tenga instalado este lenguaje de programación en la máquina para poderlo ejecutar, lo cual lo hace muy transportable se puede ejecutar en Windows, Mac, Linux y Unix. Este programa posee una poderosa interface grafica (Figura 11.), pero su mayor potencial se obtiene del uso de comandos que se ejecutan en una consola externa, en esta consola se puede ejecutar scripts completos que reúnan una o varias listas de comandos (35).

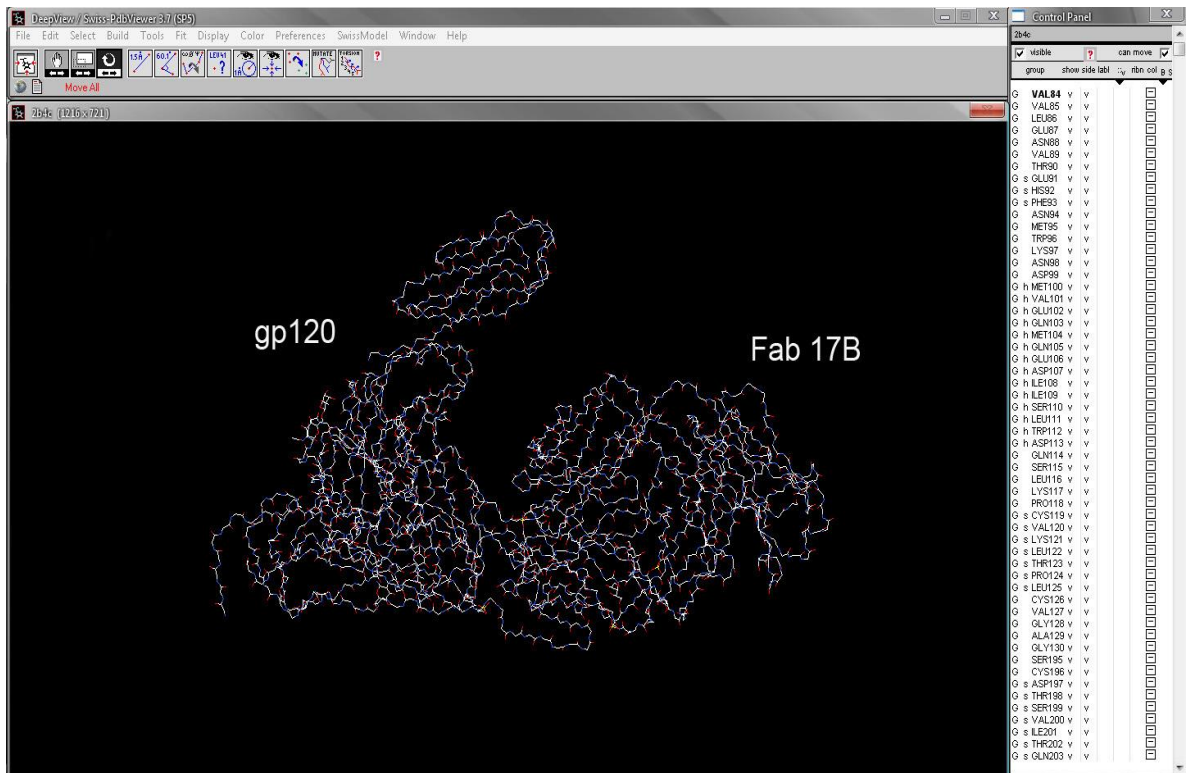
Figura 11. Interface de PyMOL



*Se observa un grafo molecular con efecto de transparencia (Captura de pantalla).

4.19.3. Swiss-pdbviewer/deepview. Programa de visualización de archivos de coordenadas moleculares de distintos formatos, es de fácil utilización por lo cual se ha hecho muy difundido, disponible para Windows, Mac, Linux y UNIX (Figura 12.) (34). Dentro de sus múltiples funcionalidades se encuentran herramientas que permiten analizar varias estructuras al mismo tiempo, sobre posición de proteínas, mutar aminoácidos, calcular distancias de enlace, de puente de hidrógeno o ángulos o distancias entre dos átomos, lectura y análisis de archivos con mapas de densidad electrónica. Además SPDBV tiene una conexión directa con el servidor de modelado por homología Swiss Model y algunas herramientas de minimización de energía. De esta forma, la aplicación se convierte en un pequeño laboratorio de modelado donde se pueden generar y analizar modelos en un tiempo bastante reducido y al alcance de todos (34, 35).

Figura12. Interface de DeepView.



*En la imagen se observa el complejo de unión de un fragmento Fab de una inmunoglobulina G (IgG) anticuerpo Fab17B con la gp120 del VIH-1. (Captura de pantalla, archivo pdb, código: 1igc).

5. ANTECEDENTES

Sobre el VIH existe tanto material de investigación hasta la fecha, que sería muy dispendioso abarcar todas las posibles publicaciones existentes sobre el tema (92). Sobre este virus se ha invertido tal vez la mayor cantidad de dinero en investigación que sobre ningún otro en la historia de la humanidad, sin embargo, la realización de una vacuna eficaz hasta el momento ha sido una tarea infructuosa (79, 59). Esto probablemente sea debido a que aun no se conocen completamente los detalles de cómo opera el virus y a que existen numerosas opiniones de investigadores muy calificados en el tema que aun no logran ponerse de acuerdo, de hecho, no están muy convencidos de que el VIH produzca SIDA, tanto así, que algunos investigadores, como es el caso de la Dra. Rebecca V. Culshaw, Ph.D. de Dalhousie University de Canadá, Matemática bióloga quien ha trabajado con modelos matemáticos de la "infección por VIH" durante los últimos diez años, y que presento su renuncia formal a la investigación sobre modelos matemáticos en VIH ya que considera que el VIH no es la causa del SIDA (24). Sin embargo y sin tomar en cuenta opiniones particulares, amparándose en los últimos hallazgos científicos sobre el virus del VIH, se tomara la posición de que el VIH sí es el agente etiológico del SIDA (1, 16, 64).

Concebir el modelado molecular para la construcción de vacunas sintéticas, sin el aporte multidisciplinario de ciencias como: la biología (ej. análisis de función biológica), las matemáticas (ej. ecuaciones diferenciales, topología), la física (ej. mecánica cuántica, mecánica estadística, mecánica molecular), la Bioquímica (ej. complejos de Michaelis entre enzimas y sustratos), la Inmunología (ej. complejos antígeno-anticuerpo), la Química (interacciones entre moléculas "huéspedes" (guests) y "hospedadoras" (hosts)), las ciencias de la computación (ej. Algoritmia de sistemas complejos, nuevos procesadores, esta tal vez la mayor herramienta para el mundo científico). Sería imposible, de hecho el aporte sustancial de estas disciplinas es lo que ha permitido muchos de los avances realizados en farmacología y vacunología hasta la fecha (8).

La visión moderna en la actualidad es de alcanzar un sueño plasmado en la biología molecular, que es el de poder crear proteínas sintéticas que se plieguen de la forma deseada y que por lo tanto desarrollen una función prevista (que no tiene que ser necesariamente una función presente en los seres vivos) (35). Este sueño casi se ha conseguido con ayuda de las diferentes disciplinas y herramientas mencionadas anteriormente. Uno de los pasos más grandes en la búsqueda de este sueño lo ha generado "la ingeniería de proteínas", esta disciplina integradora nos ha permitido vislumbrar este panorama, permitiendo el diseño y aparición de algunas pequeñas proteínas sintéticas (12, 16, 75), con

especial interés en el desarrollo de fármacos nuevos o mejorados y de la investigación en vacunas sintéticas. Si bien es mucho lo que se ha avanzado en este campo aun queda no menos por saber, en especial, de la energética, plegamiento y estabilidad de proteínas (35).

Actualmente existen innumerables trabajos sobre simulación con DM de macromoléculas biológicas, pero a su vez, existen pocos publicados sobre posibles vacunas sintéticas modeladas computacionalmente, a continuación se mencionaran algunos.

Uno de los primeros y tal vez el más importante trabajo sobre vacunas sintéticas fue desarrollado por el científico colombiano Manuel Elkin Patarrollo, en el cual presenta la posibilidad de generar inmunidad protectora contra la malaria, usando péptidos sintéticos, la vacuna sintética candidata SPf66, diseñada y sintetizada químicamente en Bogotá-Colombia, fue la primera vacuna contra la malaria en llegar a estudios de Fase III con resultados satisfactorios. Esta vacuna multiestadío era un péptido sintético cuyo monómero consistía en la secuencia de aminoácidos de tres proteínas del estadio asexual del parásito (83, 55 y 35 kDa) del *P. falciparum*. Estas secuencias estaban unidas por la secuencia PNANP derivada de la proteína del circumsporozoito del parásito (estadio infectivo) (74). La SPf66 fue una vacuna diseñada esencialmente para disminuir la morbi-mortalidad ocasionada por la invasión de los merozoitos a los glóbulos rojos (75).

El tratar de desarrollar una vacuna sintética se ampara en que, muchas investigaciones revelan que péptidos sintéticos modelados y sintetizados son eficaces tanto en diagnóstico como en la inducción de potentes respuestas inmunológicas humorales (12, 41, 74, 75) y citotóxicas (58), esto hace pensar que estos péptidos podrían ser efectivos para el tratamiento de pacientes crónicamente infectados por los virus de la hepatitis B (HBV) y C (HCV). Para los cuales, la única alternativa actual de tratamiento es el interferón alfa (IFN- α) recombinante, con una eficacia solo del 30%. Y también para pacientes con VIH-1 donde la terapia antiretrovirica es su única oportunidad para frenar el progreso de la infección a costo de unos enormes efectos secundarios, en este último caso se han modelado péptidos sintéticos por ingeniería de proteínas que han logrado inducir linfocitos T citotóxicos en ratón contra VIH-1 (58). Borrás-Cuesta y colaboradores del Departamento de Medicina Interna de la Universidad de Navarra en Pamplona España, en 1999, utilizando el programa Hyperchem (Hypercube and Autodesk Inc. San Rafael, California, USA), modelaron los péptidos candidatos a ser modificados y utilizados en terapias contra hepatitis B y C logrando mejores valores terapéuticos que con medicación convencional (42).

Trabajos complementarios para el desarrollo de vacunas por diferentes metodologías, son los que permiten resolver las estructuras tridimensionales de los complejos formados entre proteínas del virus y del hospedero (humanos y algunos modelos animales), estos estudios permiten que se obtenga información muy valiosa de los fenómenos que ocurren durante el proceso de infección, esta información analizada y procesada permite develar más sobre la compleja biología y etiología del VIH, además de suministrar información sobre posibles blancos antigénicos que sirvan como template o plantilla para la obtención de un candidato a vacuna (52, 55). Uno de los trabajos clásicos del modelado de un posible complejo de acoplamiento antígeno-anticuerpo (modelo de interacción proteína-proteína) fue realizado por: Peter D. Kwong & Richard Wyatt del Howard Hughes Medical Institute y el Departamento de Bioquímica y Biofísica Molecular, de la Universidad de Columbia (56), este trabajo contó con una enorme participación de institutos, investigadores y empresa privada, En este trabajo se observa la caracterización de los enlaces de cada uno de los átomos vinculados en el complejo de unión entre un fragmento Fab de una inmunoglobulina G, es decir IgG, de un anticuerpo humano, con la proteína gp120 del una cepa del virus VIH-1. Lo más importante de este trabajo es que presento los archivos de coordenadas moleculares de los complejos formados en alta resolución. Estos archivos fueron fundamentales para la realización de este trabajo.

Estudios más recientes de cristalografías de VIH-1, muestran los posibles blancos de ataque y unión de anticuerpos sobre las moléculas de anclaje del virus, lo cual evitaría que el virus pueda acoplarse a la célula hospedera, brindando por lo tanto protectividad permanente contra la infección, estos estudios ofrecen enormes datos computacionales sobre estructuras dilucidadas en alta resolución en archivos de coordenadas moleculares *.pdb, estos datos son clave para el inicio de las simulaciones de dinámica molecular, escogencia de blancos y verificación de propiedades termodinámicas iniciales (88). Ollman y colaboradores en el 2001, mostraron la cristalografía del anticuerpo IgG1 b12, de 2.7 angstroms (Å) de resolución, la cual puede ser la base para la construcción de una vacuna. Este estudio demuestra que los anticuerpos pueden generar una potente neutralización en aislados primarios de VIH-1, por lo tanto se inhibe la infección de virus a la célula hospedera (72).

Estos estudios, más el enorme avance en técnicas de secuenciación y conocimiento de la respuesta inmune en humanos y modelos animales, han permitido dilucidar los mecanismos moleculares básicos, por ejemplo: la importancia que tiene el complejo mayor de histocompatibilidad para la investigación y desarrollo de posibles vacunas en el futuro inmediato (29, 47, 89).

Existen otros numerosos trabajos de diferentes compañías farmacéuticas sobre el desarrollo de posibles vacunas sintéticas contra VIH pero todos ellos fueron infructuosos. Ejemplo de estos intentos infructuosos se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 2. Diferentes tipos de vacunas que se han intentado realizar por diferentes instituciones hasta el año 2007 contra el VIH.

Vectores Virales :	Institución o Empresa Investigadora
Adeno	
Adenovirus 5 (Clade B)	Merck
Adenovirus 5 (Clades A,B,C), [DNA]	NIH
Adenovirus 6 (Clade B)	Merck
Vectores Virales —Pox	
Canarypox (Clade B/E), gp120 boost	Aventis
MVA (Clade C) [DNA]	IAVI-ADARC
MVA(Clade C)	IAVI-Therion-India
MVA (Clade B), [fowlpox]	Therion
MVA (Clade A/E), [DNA]	WRAIR
NYVAC (Clade C)[DNA]	EuroVac
Otros	
VEE (Clade C)	AlphaVax
AAV-2 (Clade C)	IAVI-CRI-TGEN-CHOP
Vectores de DNA :	
Clade C, MVA boost	IAVI-ADARC
Clade B—minigenes	Epimmune
Clade B—nuclear anchor	FIT Biotech
Clade B, MVA boost	GeoVax
Multiclade—A,B,C, Ad5 boost	NIH-VRC
Clade B—Micro particle, gp140 boost	Chiron
Multiclade, gp120 boost	U. Mass
Multiclade—ABC, MVA boost	Karolinska
Clade C	Johns Hopkins
Clade B/C, NYVAC boost	EuroVac
Clade B—IL12, IL—15, peptide boost	Wyeth
Subunidades Proteicas :	
gp120 [canarypox prime]	VaxGen
gp120-multiple [DNA prime]	ABL
Oligomeric gp140 [DNA prime]	Chiron
P24 +fragment gp41	NCI-Ivanovsky-Russia
Gag,nef-tat	GSK
Subunidades — Peptídicas :	
Lipopeptides [ALVAC prime]	ANRS
Multi-epitopes in GMCSF [DNA prime]	Wyeth

*Fuente : AIDS vaccine blueprint, IAVI, 2006

6. METODOLOGÍA

6.1 MATERIALES Y MÉTODOS

6.1.1 Primera fase del estudio: Revisión de los Modelos de Vacunas en la Literatura. En la primera fase del estudio se analizaron algunas de las deficiencias que presentan los diferentes modelos de las vacunas que se han intentado realizar contra el VIH. En este caso en particular, para el VIH-1 la International AIDS Vaccine Initiative (IAVI) (44) define 4 tipos de vacunas que se encuentran en diferentes fases de desarrollo:

- 1) **Vacunas virus atenuados:** Estas vacunas utilizan una forma debilitada del patógeno. Este cambio se realiza para que el patógeno no vaya a ser dañino. La introducción de esta forma del agente patógeno en el humano busca imitar la infección sin causar enfermedad, lo cual eventualmente generara que organismo produzca una respuesta inmune contra dicho patógeno. Este tipo de vacuna ha sido muy efectivo en enfermedades como el sarampión, la poliomielitis (Sabin), vacuna intranasal contra la gripe (44).

Vacunas vivas atenuadas contra VIH, no se están desarrollando para su uso en seres humanos por razones de seguridad, pero continúan en investigación, ya que se han realizado estudios de vacunas de virus atenuadas contra el VIH, in-vitro y en modelos animales, donde se muestran altos niveles de protección. Es posible que en algunos años cuándo se debele aun más sobre este tipo de vacuna se puedan hacer ensayos en humano, sin embargo no existen planes actuales para una prueba de vacuna por virus atenuados contra el VIH en ensayos humanos (81).

- 2) **Vacunas de subunidades:** Son vacunas diseñadas de subunidades o fragmentos pequeños de proteína del agente patógeno. En el cual estos segmentos de proteínas actúan como antígeno, lo cual desencadena un proceso de respuesta inmune. En este caso las células B del sistema inmune producen anticuerpos contra el antígeno. Generándose gracias a esta exposición, una serie de anticuerpos neutralizantes contra el antígeno introducido, teniéndose al final una inmunidad protectora. Es decir que cuando el patógeno penetra en el organismo, las células B de memoria reconocen el patógeno generando una respuesta potente y específica (44).

Algunas vacunas de subunidades caben en la denominación de vacunas sintéticas ya que se elaboran con péptidos sintéticos basados en las moléculas de superficie del patógeno. Cabe aclarar que las primeras vacunas contra el SIDA desarrolladas y probadas fueron diseñadas utilizando el concepto de subunidad. En este caso la primera vacuna contra el SIDA que paso a estudio de fase III en humanos fue la vacuna AIDSVAX gp120, la cual es una vacuna de subunidades sintéticas de gp120, y en su estudio clínico durante las Fases 1 y 2 se reformuló para incluir la proteína gp120 de 2 cepas variantes de VIH. Por lo tanto es una vacuna bivalente (que incluye proteínas de 2 cepas de VIH) esto en busca de mejorar la magnitud y la calidad de la respuesta inmunológica (44). En ensayos de eficacia esta vacuna no generó inmunidad contra la infección por el VIH, sin embargo se sigue investigando con ella para descubrir conceptos que permitan llegar a una mejor vacuna.

Se han diseñado otras vacunas a partir de gp120 que carece de V2 y V3 para dejar expuestos los epitopes de adhesión al CCR5 e inducir anticuerpos contra esta región oculta. Este tipo de vacuna no funcionó debido a que los anticuerpos generados son demasiado voluminosos y generan gran impedimento estérico, lo cual los inhabilita para bloquear la región de acople al CCR5 cuando es exhibida por el virus luego de anclarse a la CD4 (4, 57).

Otro intento de vacuna se hizo produciendo una proteína gp120 acoplada con un imitador de CD4 que induce la exhibición del receptor de CCR5 para inducir anticuerpos contra esta región exhibida. Los Anticuerpos producidos contra esta región exhibida son inofensivos por la misma causa del punto anterior: los anticuerpos son muy grandes (impedimento estérico) y no alcanzan a bloquear el segundo receptor del virus (30, 57).

El principal problema que ha llevado al fracaso de las vacunas sintéticas de subunidades existentes es que aunque estas vacunas pueden activar linfocitos T citotóxicos y linfocitos productores de anticuerpos, no inducen una respuesta inmune lo suficientemente fuerte en humanos para protegerlos de la infección por el virus. Otros de los inconvenientes de las vacunas sintéticas en sus diferentes versiones, es su incapacidad para representar fielmente a las estructuras proteicas del patógeno en su estado nativo, debido a que tales estructuras artificiales sufren plegamientos indeseados en su conformación tridimensional. Por otro lado, los péptidos sintéticos sufren procesos de degradación relativamente rápidos en el plasma sanguíneo, lo cual disminuye bastante su tiempo de exposición a

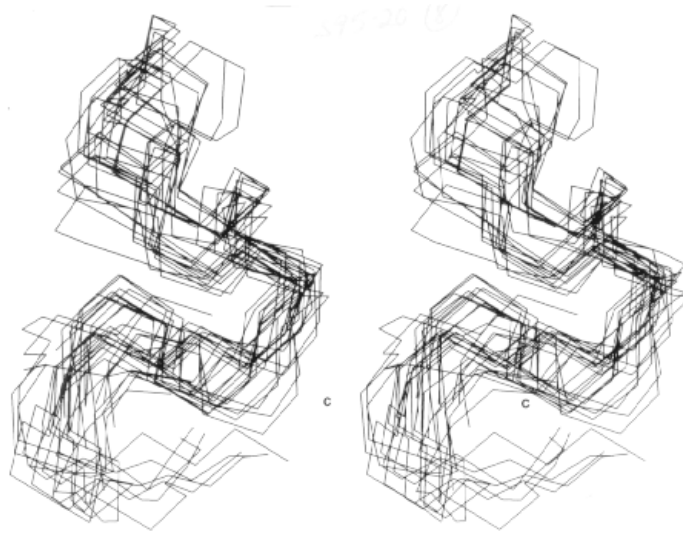
las células comprometidas en generar la respuesta inmunitaria (75, 86, 100).

Resumiendo, entre los Inconvenientes que presentan las vacunas sintéticas se encuentran los siguientes (100):

- La estructura tridimensional del péptido sintético no representa fielmente al antígeno natural en la mayoría de los casos.
- El péptido-vacuna no protege contra todas las formas polimórficas infecciosas presentadas por el patógeno.
- La mayoría de los Péptidos Sintéticos tienen un bajo valor antigénico e inmunogénico.
- Para transformar un péptido no-antigénico en antigénico se recurre a la sustitución de residuos de aminoácidos.

Normalmente estos Péptidos Sintéticos generados sufren plegamientos indeseados, como consecuencia principalmente del acoplamiento entre residuos con cadenas laterales de cargas eléctricas complementarias: Aspartato con Arginina o Lisina con Glutamato, etc (100). Siendo el número de conformaciones tridimensionales que puede adquirir un péptido, inversamente proporcional a la distancia entre aminoácidos con carga eléctrica complementaria, esto significa que en cuanto más cercanas estén entre sí las parejas de residuos con cargas eléctricas complementarias, el péptido presentará muchas más conformaciones diferentes (Figura 13.). De acuerdo con las tablas de conformaciones tridimensionales de Dewitte, para una distancia de 20 residuos de aminoácidos el número promedio de conformaciones generadas es de 1000 (25, 100).

Figura 13. Conformaciones tridimensionales de un Péptido Sintético



*Tomado de (25)

Patarroyo y colaboradores en 1998 demostraron que péptidos sintéticos pueden desencadenar una respuesta inmune protectora frente algunos patógenos, sin embargo, estas vacunas sintéticas en sus diferentes versiones a lo largo de los últimos años y en numerosas pruebas, han presentado muchos inconvenientes, pues además de ser extremadamente complejas, pueden sufrir plegamientos inadecuados que no representan correctamente la estructura tridimensional de los antígenos del patógeno adquiriendo múltiples conformaciones espaciales, además pueden sufrir procesos de degradación relativamente rápidos en el torrente sanguíneo y ser poco inmunogénicas (75, 74, 100).

- 3) **Vacunas de DNA:** Este tipo de vacuna utiliza copias de uno o varios genes de los patógenos, se busca que los genes del patógeno insertados en células humanas produzcan proteínas blanco del patógeno, para que una vez expresadas estas induzcan inmunidad protectora. Cuando la proteína del patógeno se expresa, el sistema inmunológico ve como extraño al antígeno expresado, esto desencadena una respuesta inmune. El sistema inmunológico recuerda esta respuesta, y preparará una respuesta en contra de todo el patógeno (44, 48).

Esta es una estrategia común en la actualidad que se utiliza para desarrollo de una vacuna contra el SIDA, existiendo en la actualidad muchas vacunas

candidatas contra el SIDA basadas en este principio. En este caso las vacunas de ADN no causa la infección por el VIH, porque las vacunas no contienen todos los genes del patógeno en vivo. Por lo cual este tipo de vacunas de ADN generan grandes esperanzas, pero existen algunas dudas, aún sin resolver, sobre su seguridad. Se desconoce si estas vacunas pueden llegar a provocar carcinogénesis o si la circulación de ADN tras inyectarse en el huésped puede acabar afectando a las células germinales, provocando problemas de tolerancia al patógeno en la descendencia. Además se contempla la posibilidad de que las personas inmunizadas de esta forma desarrollen enfermedades autoinmunes secundarias al tratamiento (48, 59).

- 4) **Vacunas recombinantes:** Utilizan la misma estrategia de las vacunas de ADN, pero los genes son transportados por un vector bacteriano o viral inofensivo o muy debilitado, Es este caso los genes se adjuntan al ADN del vector, siendo este último inoculado en el humano y este se encargará de integrar el los genes del virus al huésped. Generándose como efecto una producción de proteínas que posteriormente desencadenaran una respuesta inmune, tal como se ha descrito anteriormente para las vacunas de ADN.

Esta estrategia también es común en la búsqueda de una vacuna contra el SIDA, existiendo muchas vacunas candidatas contra el SIDA, que utilizan los vectores recombinantes. En este caso las vacunas recombinantes no causan infección por VIH debido a que contienen copias de un sólo o varios genes del VIH, no todos ellos. Se estima por parte de algunos miembros de la comunidad científica que la adición de un vector permitirá a la vacuna ser más eficaz en la generación de una respuesta inmune protectora, que el uso de una vacuna de ADN en solitario.

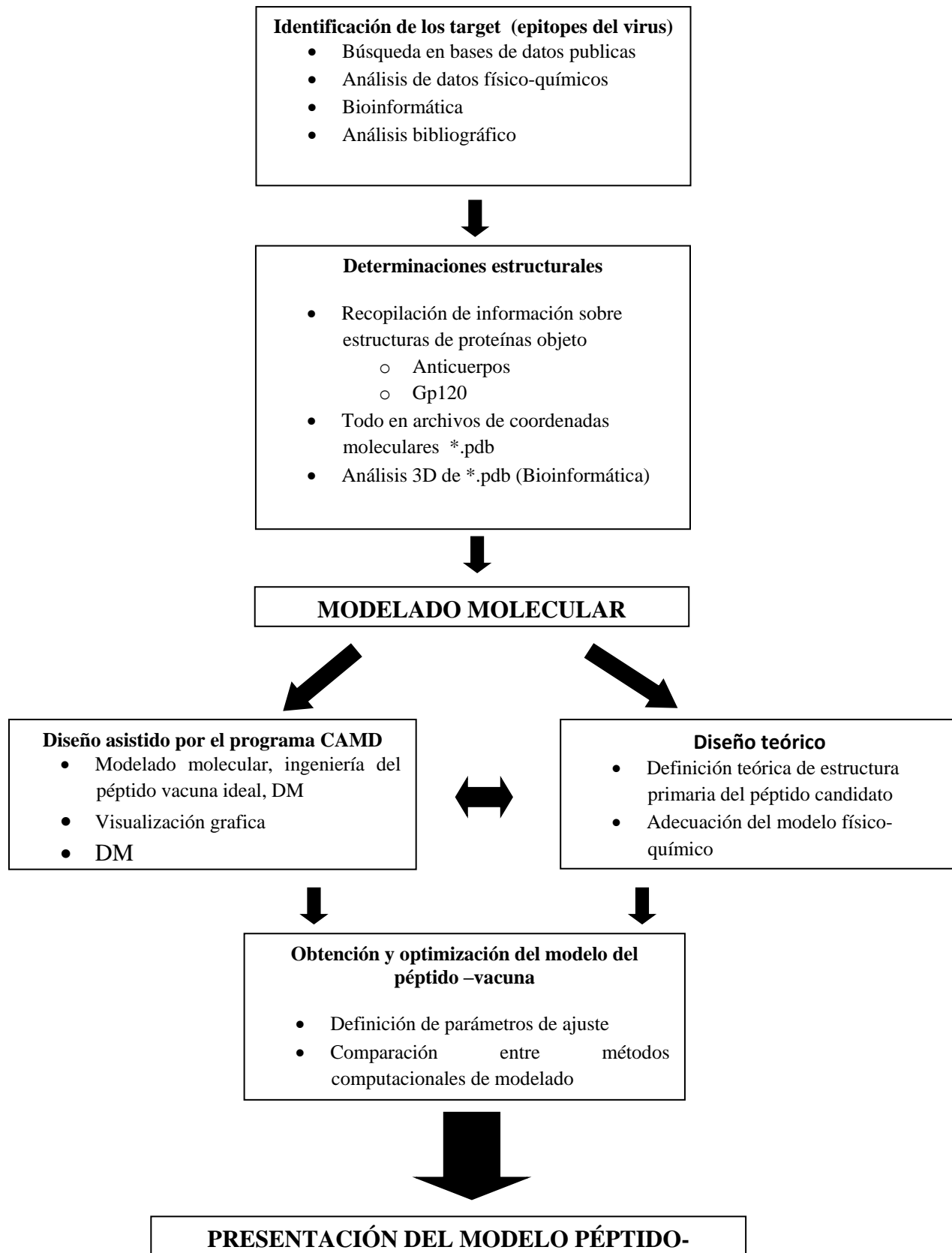
De lo anterior se deduce que una vacuna eficaz anti-VIH debe activar la producción de anticuerpos capaces de neutralizar a todos los virus infecciosos de VIH que penetren al organismo en el momento de la infección. Además, pruebas realizadas con cultivos celulares indican que la concentración de tales anticuerpos, debe ser muy elevada para lograr bloquear eficientemente la entrada del virus en las células (7, 20). Ninguna de las vacunas diseñadas por las diferentes metodologías existentes, antes mencionadas, han demostrado ser eficaces en la prevención de la infección por VIH (59).

6.1.2 Segunda fase del estudio: Diseño del Modelo. En la segunda fase del estudio se realizó a partir de la información revisada en la **Primera fase del estudio**, con la cual se diseñó de acuerdo a un plan de ejecución, un **Flujograma de Procesos** (figura 14). Posteriormente, se realizó un análisis exhaustivo en la base de datos pública del proteoma del virus VIH-1 www.hiv.lanl.gov, la cual es soportada por el Laboratorio de Seguridad Nacional de los Álamos y el Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (NIH). De esta base de datos se tomaron las secuencias de trabajo y se analizaron los mapas de antígenos del VIH-1 HXB2, obteniendo de esta base de datos la información de las secuencias de 136 sub-tipos aislados de VIH; los 136 proteomas se encontraron perfectamente anotados y organizados (Figura 15 y 16). Luego se buscaron los archivos de coordenadas moleculares con suficiente resolución para ser adecuados, preparados y limpiados para su utilización en el proyecto, estos archivos se tomaron de la base de datos www.pdb.org (1IGT, 1IGC, 2NY7) (figura 17). Se realizó un análisis 3D, de los posibles blancos de ataque a la proteína de anclaje gp120 del virus, la cual es el principal mecanismo de anclaje a CD4+; se analizaron blancos para la posible construcción del péptido sintético candidato, tomando los reportes de los sitios más antigénicos reportados en bibliografía (3, 20, 55, 56).

Con base en lo anterior, la proteína de cubierta gp120 es entonces nuestro principal objeto de estudio para proponer un diseño de vacuna. En esta proteína viral los resultados experimentales han indicado que la región β 23 actúa como anclaje a los linfocitos, mientras que la β 20 actúa como proteína de fusión a la célula. La hoja β 20 de la molécula gp120 permanece oculta hasta el momento en que el virus se acopla a la molécula CD4, en ese momento la proteína viral sufre un cambio conformacional con lo cual esta hoja queda exhibida (57, 95).

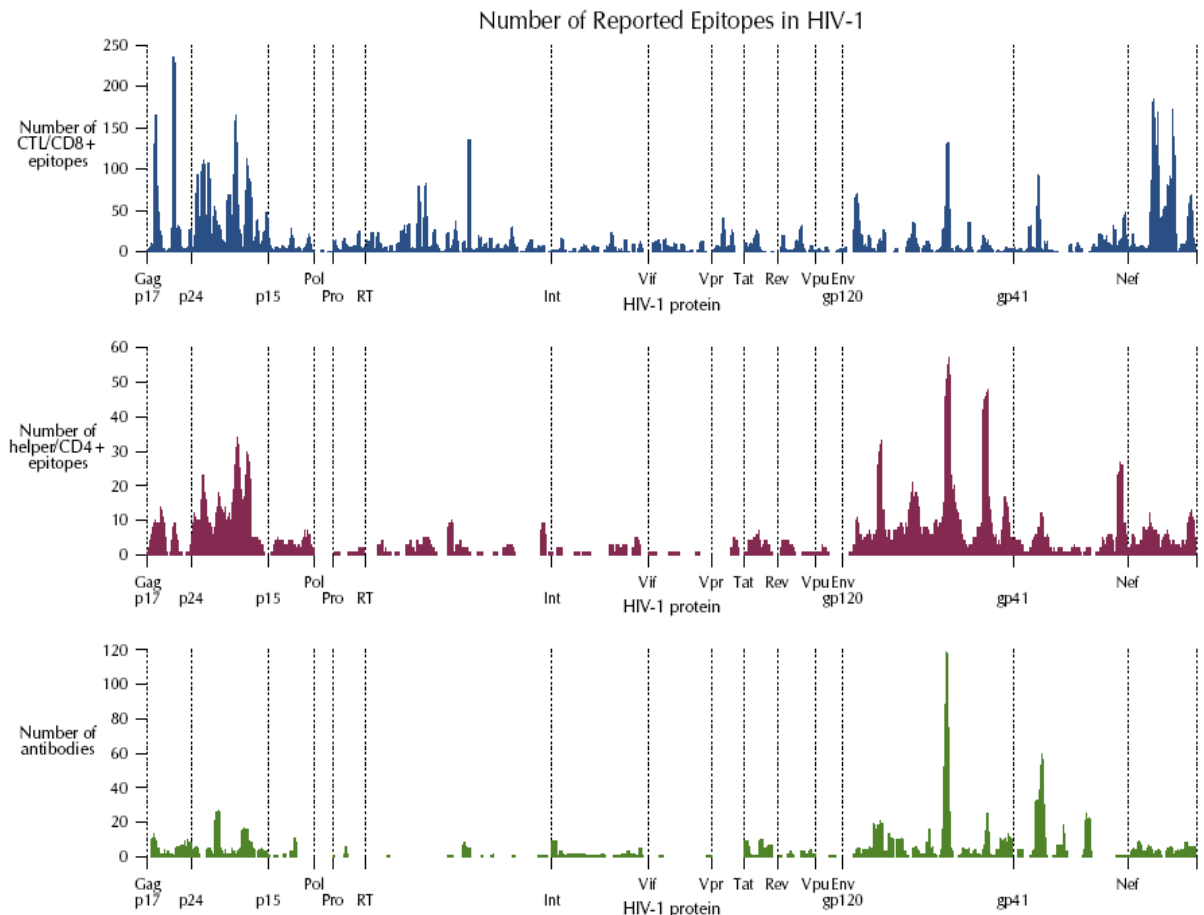
A partir de esto los autores deducen que el acople de la región β 23 del virus con el CD4 de los linfocitos es el factor crítico que induce el cambio conformacional en la proteína viral, por esto razón se cree que un anticuerpo dirigido contra la región β 23 puede inducir este mismo cambio conformacional por sí solo. Las investigaciones realizadas por otros grupos han demostrado que no solo el acople de la gp120 a CD4, sino también el acople de anticuerpos a la gp120 puede inducir substanciales cambios conformacionales. En esas investigaciones se analizaron 20 anticuerpos que inducían cambios conformacionales en la proteína, los cuales presentaban inusitados valores de entropía al acoplarse a la gp120, generando una energía libre promedio de 26.1 kcal/mol. (54).

FIGURA 14. FLUJOGRAMA



A partir del análisis de secuencias proteicas se encuentra que la mayor área de anclaje de la gp120 con el CD4 está exactamente en la región β 23 (88, 92). Mientras que la segunda mayor área de acople con el CD4 es la β 20, la cual se mantiene oculta todo el tiempo hasta el momento final del acople. De esto deducimos que el inductor de cambio conformacional de la gp120 es el contacto del CD4 con la hoja β 23 de la proteína viral.

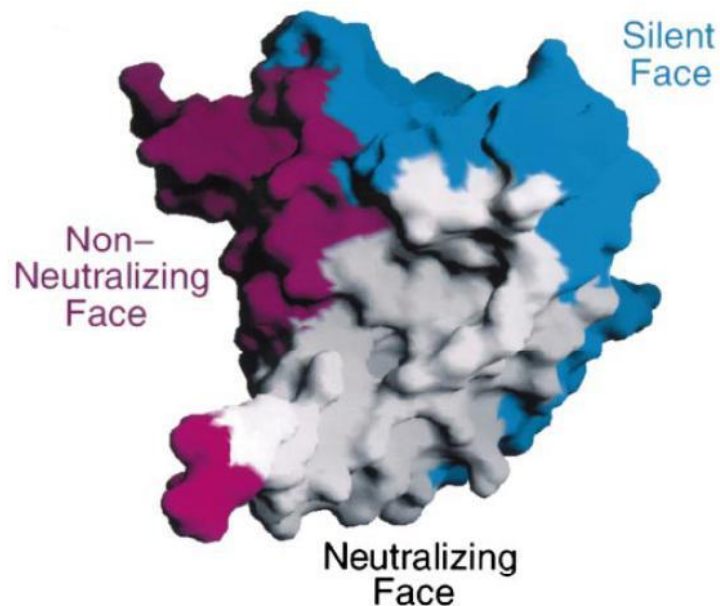
Figura 15. Distribución de epitopes gp120.



*Número de epitopes único incluido en la base de datos que abarcan cada una una posición en el proteoma del VIH.

Los análisis y visualización se realizaron con DeepView, RasMol y Pymol, de acuerdo con la bibliografía consultada y los análisis realizados, la estructura de la gp120 en su superficie posee tres caras en las que podemos separar su estructura (figura 18) : 1- *cara silenciosa* la cual es la región que no tiene importancia antigénica por ser altamente polimorfito y no participar en el adhesión virus-célula, 2- una *cara no neutralizante* donde su principal función es aportar ruido térmico, que desencadena competencia antigénica donde se unen varios tipos de anticuerpos pero estos no logran desencadenar una respuesta inmune eficiente, 3- por último está la *región neutralizante* que pertenece a la región V3 de la gp120, esta región ha sido por excelencia a la que más se han enfocado esfuerzos para generar anticuerpos neutralizantes. La mayoría de los intentos de dirigir una vacuna hacia V3 ha fracasado, debido a la alta variabilidad de esta región. Nuestros esfuerzos se centraron en inducir un cambio conformacional de la gp120 dirigiendo un anticuerpo hacia $\beta 23$, ocasionando con esto la exposición de la $\beta 20$ al que se dirigirá un segundo anticuerpo neutralizante.

Figura 18. gp120 clasificación de la estructura por regiones

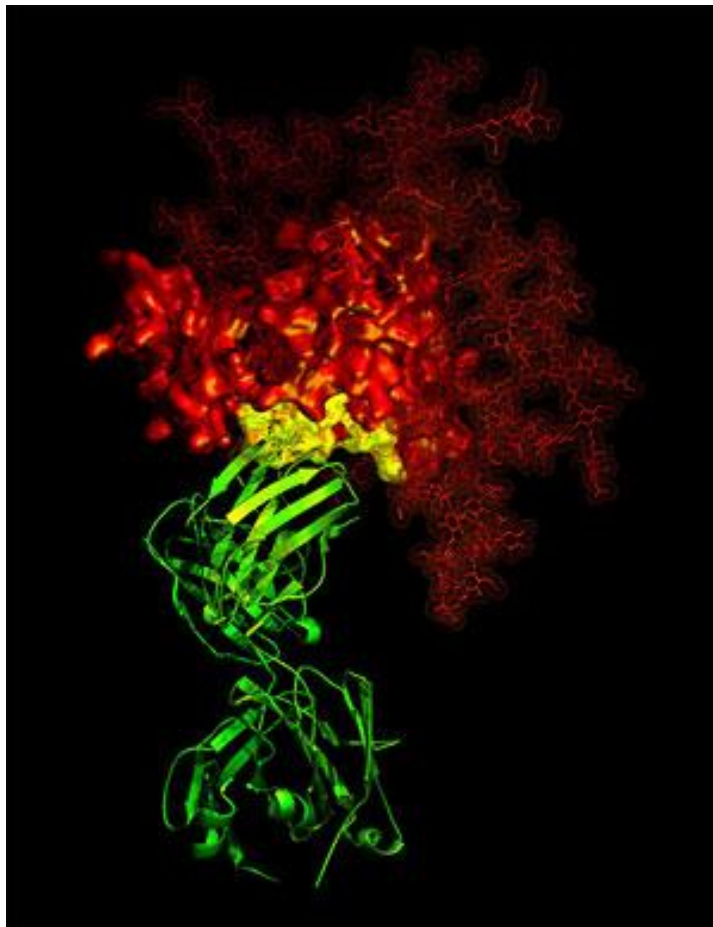


*la gp120 posee tres sectores de los cuales uno se ha convertido en el blanco más probable de ataque para una vacuna (55).

La enorme diversidad de cuasi-especies de VIH-1 en un paciente infectado, las propiedades dinámicas de la gp120, proteína de anclaje del virus a células CD4+, como lo son su alta glicosilación y su flexibilidad conformacional, hacen muy complejo la escogencia de posibles blancos para la construcción de una vacuna,

sin embargo la literatura reporta regiones de la gp120 conservadas a las que se unen anticuerpos neutralizantes, estas regiones como la región de unión al anticuerpo 17B, este anticuerpo se fija a β 20, generando inmunización lo cual lo convierte en una excelente oportunidad para generar un blanco para una potencial vacuna efectiva contra VIH y un gran antecedente de nuestros blancos antigénicos (56).

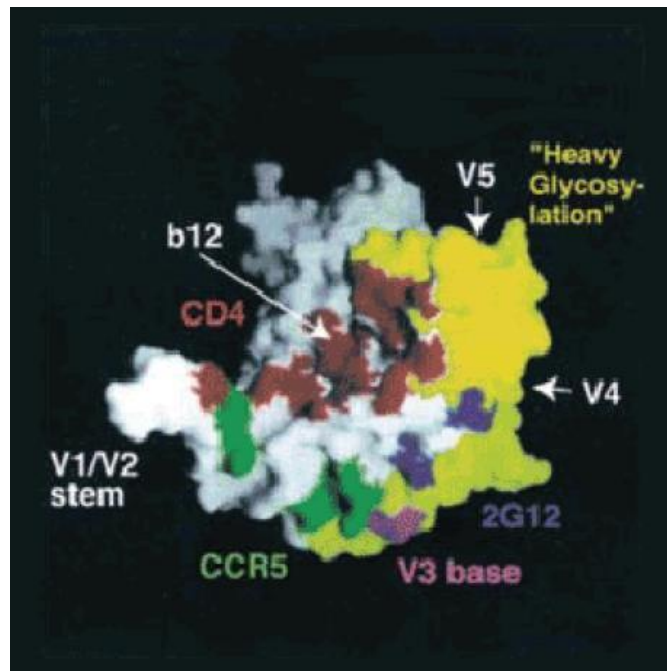
Figura 19. Complejo de unión anticuerpo B12 a gp120



*Se observa el complejo de unión de un anticuerpo b12 (Verde) neutralizante a la gp120 (rojo) del VIH. (53)

Las diferentes secuencias proteicas escogidas como blancos antigénicos para la construcción del péptido vacuna candidato ideal, se tomaron de las tablas de mapeado de antígenos del VIH. Dadas las características inmunizantes del anticuerpo B12 reportadas en literatura, se construyó con la misma metodología un péptido vacuna candidato dirigido a la zona de neutralización de B12, esto con el fin de tener un blanco antigénico adicional, disponible como modelo (Figura 20) (3, 43, 53).

Figura 20. Regiones de acoplamiento y neutralización del anticuerpo B12

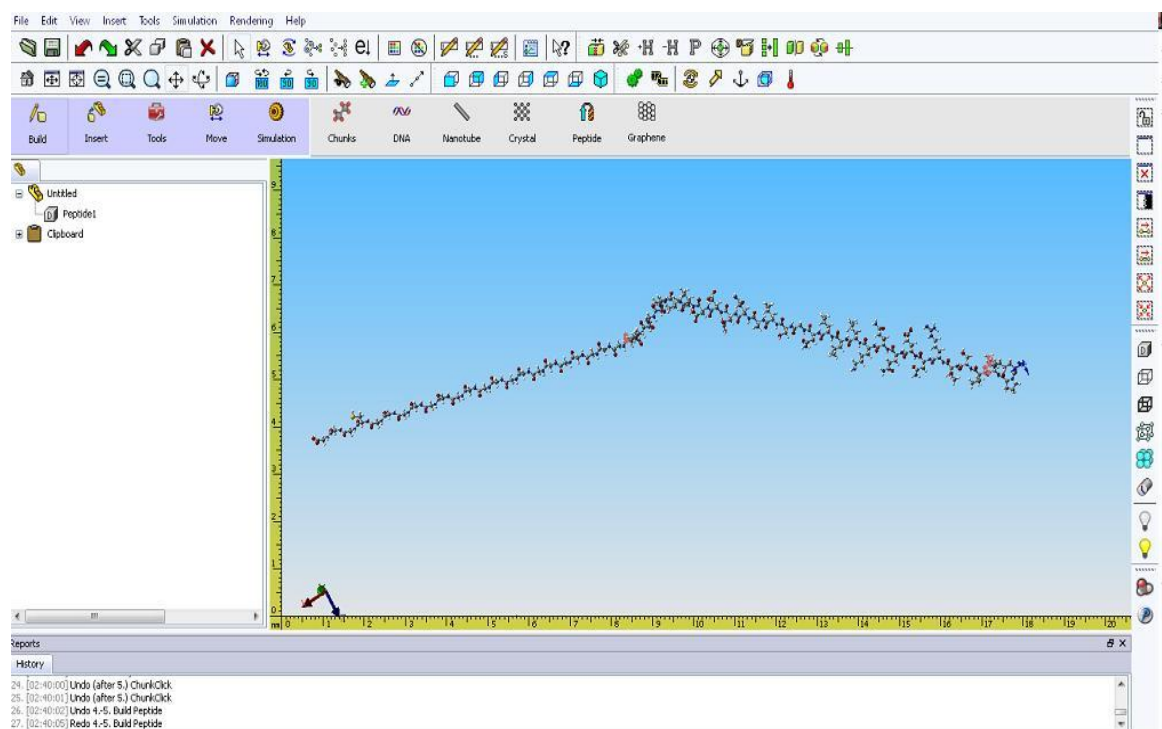


*Detalle de la zona de acoplamiento del anticuerpo B12 a gp120 la zona de acople esta en rojo (3)

6.1.2.1 Desarrollo del modelo computacional CAMD: Se inicia con la instalación y corrección de paquetes en un servidor de alto procesamiento, la instalación de NE1 se realiza en el sistema operativo Kubuntu 7.10 y Windows XP sp2. Se realiza la construcción y optimización del modelo del péptido vacuna candidato, para lo cual se obtiene el modelo en su estado de mínima energía; se ejecutaron las simulaciones con los dos motores de simulación escogidos, en el motor nativo de NE1 y en el de GROMACS+HPF5. Las simulaciones consumen un gasto considerable de tiempo de simulación por lo tanto es importante el ajuste del péptido modelo. Los dos sistemas de simulación no muestran en absoluto ningún tipo de diferencia significativa al comparar los archivos de coordenadas de las trayectorias de simulación.

La interface de NE1 ofrece un sistema de inserción automático de secuencia para la construcción del péptido sintético a modelar (Figura 21), aquí se obtiene la estructura primaria del péptido candidato a modelar. A este modelo inicial se le debe ajustar su energía para regular las energías de acople iniciales de los enlaces peptídicos de la estructura primaria del péptido.

Figura 21. Interface NE1 estructura primaria del péptido candidato



*Estructura primaria del modelo, marco de lectura con secuencia blanco y cadena complementaria de estabilización de poly-gli.

El diseño monomérico del péptido es una hoja β antiparalela, compuesta de una región con la información del antígeno blanco de ataque. Con el fin de inducir un giro al final de la cadena con la información antigénica, se agregó una prolina que genera un giro de una cadena de poly-gli, a esta región la llamamos región de complemento y estabilización. Con esta región compuesta de una cadena de poly-gli se buscó estabilizar la cadena blanco por medio de enlaces de hidrógeno, donde la resultante sería una hoja β antiparalela.

6.1.2.2 Simulación. Luego se procedió a simular el péptido modelo en NE1, el sistema de minimización de energía se realizó con el motor de simulación de GROMACS+HDF5, las condiciones para la construcción del modelo fueron ideales, es decir se minimizo y se simulo con dinámica molecular a temperatura y presión constante. La temperatura de simulación se fijo a 310K que es la temperatura normal de un humano, la presión se dejo como viene ajustada por defecto en el motor de simulación, esto debido a que este motor de simulación esta optimizado especialmente para el trabajo con DNA y proteínas. El tiempo de recorrido para las simulaciones fue de 900 cuadros, con una integración de 1 femtosegundo por cuadro.

6. RESULTADOS

Mimetismo Conformacional :

Hasta el presente, ningún laboratorio del mundo ha logrado resolver el problema de ocultamiento epitópico del VIH. Se conoce que el primer acople del virus al CD4 induce un cambio conformacional que deja exhibido en el virus un segundo segmento proteico que actúa como molécula de fusión a la célula. Ahora, según el análisis de secuencias de la gp120, encontramos que la secuencia aminoacídica continua mas energética implicada en el apareamiento a CD4 es la β 23, por lo cual deducimos que este segmento es quien induce un cambio conformacional del gp120 una vez acoplado a CD4.

En consecuencia, inferimos que se necesitan dos anticuerpos diferentes operando simultáneamente para generar una protección inmunitaria efectiva, para lo cual es necesario diseñar dos vacunas independientes diseñada con dos epitopes diferentes: el β 20 y el β 23. (Ver Fig. 22), con lo cual esperamos que ocurra lo siguiente : Primero, que el anticuerpo dirigido a la región β 23 de la gp120 induzca el cambio en la conformación de esta proteína viral, lo cual teóricamente generaría la exhibición del segundo segmento de fusión viral, el β 20. En ese momento el segundo anticuerpo (anti- β 20) entrará en acción y bloqueará a este epitope viral exhibido. En conclusión, lo que se busca con esta estrategia es lograr que el primer anticuerpo (anti- β 23) tenga una función inductora de cambio conformacional en el virus y el segundo anticuerpo tenga una función bloqueadora del acople al CCR5. Se puede pensar que al acoplar un anticuerpo a β 20, se eliminaría también el tropismo del VIH del receptor CCR5 a CXCR4, ya que el anticuerpo dirigido hacia esa zona generaría un enorme impedimento estérico.

Mecanismo viral para suprimir las respuestas defensivas del organismo:

En el organismo humano los anticuerpos protectores aparecen tarde en la respuesta inmunitaria, mientras que los anticuerpos no-neutralizantes aparecen temprano. La Evolución Molecular de los virus ha logrado que los epitopes no neutralizantes sean muy visibles (antigénicos) y que los epitopes con capacidad neutralizante sean invisibles al sistema inmunitario, por lo cual los anticuerpos con capacidad neutralizante aparecen al final de la respuesta inmunitaria primaria, cuando el virus ya ha tenido oportunidad de proliferar en el organismo, cuando ya entonces es demasiado tarde para iniciar cualquier respuesta humoral protectora.

Experimentalmente se ha encontrado que los linfocitos productores de anticuerpos neutralizantes son selectivamente infectados y luego suprimidos por células citotóxicas, esto en apariencia sería una objeción para producir una vacuna anti-VIH inductora de anticuerpos. Esto significa que solamente los linfocitos que exhiben inmunoglobulinas receptoras de superficie pueden ser infectados, mientras que los linfocitos de memoria en fase de secreción de anticuerpos neutralizantes (previamente estimulados) no pueden ser infectados porque ya no exhibirán estos receptores anclados en su superficie. Esto implica que el solo hecho de haber activado a los linfocitos con la vacuna es ya garantía de que estos linfocitos ya no serán infectados (80).

Se buscó darle una respuesta lógica al hecho de que el VIH infecte linfocitos B aunque éstos no tienen el receptor primario (receptor de anclaje) CD4, la solución que se obtuvo es la siguiente: cuando un linfocito B reconoce con su inmunoglobulina receptora la región de acople al CD4 del virus podría inducir en éste el cambio conformacional dejando exhibido el co-receptor a CCR5. Así, debido a que los linfocitos B tienen co-receptores CCR5, el virus puede hacer su acople de fusión con estos co-receptores (18).

Otra dificultad existente para la obtención de una vacuna inductora de anticuerpos es que los epitopes neutralizantes son detectados en un instante tardío de la respuesta inmunitaria por el sistema inmune debido a la competencia antigénica que le hacen todos los demás epitopes no-neutralizantes (59, 79, 88). La competencia antigénica produce enormes impedimentos estéricos y además enorme “ruido electrostático” que le impide a los linfocitos B ver los epitopes que sí son funcionales. Esto explica la falta de eficacia de las vacunas de ingeniería genética, las cuales sufrirían de competencia antigénica. Por otro lado, los epitopes neutralizantes tienen muy bajos niveles de energía por lo cual no pueden inducir respuestas humorales tempranas. Para resolver este problema, los autores decidieron emplear la región $\beta 23$ en el diseño de la vacuna para inducir una respuesta temprana, lo cual permite evadir toda competencia antigénica. Los linfocitos de memoria inducidos por este antígeno son de muy rápida activación, con lo cual se produce una secreción intensa de anticuerpos neutralizantes tempranos que neutralizarían todos los virus infecciosos.

Estabilidad estructural del péptido-vacuna :

Otro de los problemas a resolver en el diseño de un modelo de péptido-vacuna es la estabilidad conformacional del péptido obtenido. Existen diferentes formas experimentales de estabilizar un péptido sintético, pero ninguna de estas estrategias son aplicables a un sistema polimórfico como el VIH.

El modelo teórico desarrollado en este trabajo de investigación, presenta propiedades teóricas ideales de estabilidad, ya que genera una estructura de mínima energía posible para este sistema. Por otro lado, el modelo obtenido dada su estabilidad conformacional evitaría la acelerada degradación tanto en condiciones de almacenamiento como al momento de ser suministrado en humanos y permitiría exhibir una conformación molecular única y estable (104).

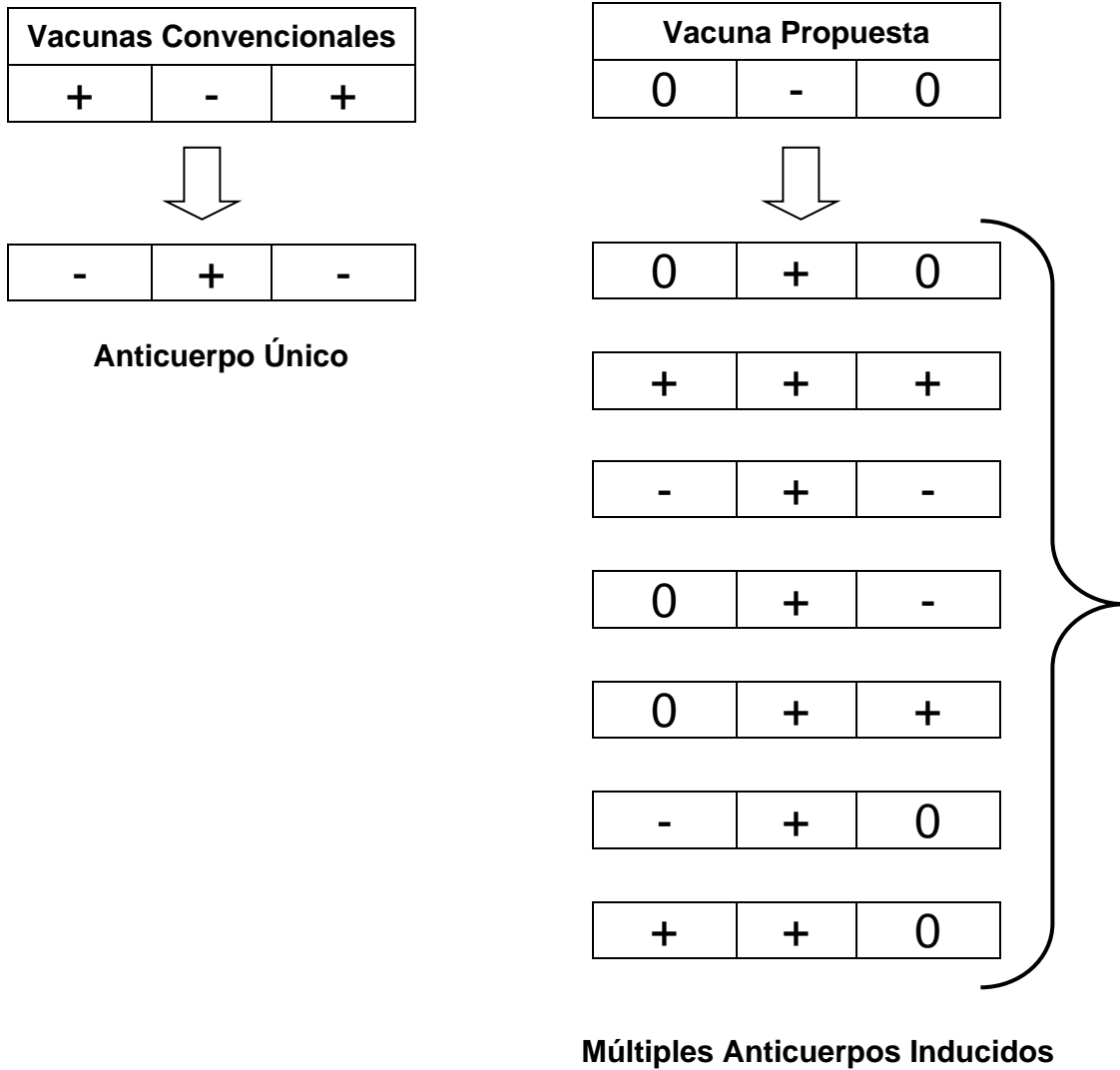
Polimorfismo viral:

Para inducir una protectividad permanente contra un virus altamente polimórfico como el VIH, se requiere inducir la producción de anticuerpos neutralizantes capaces de reconocer todas las formas polimórficas exhibidas por el virus, es decir, anticuerpos con una alta versatilidad de reconocimiento antigénico. Se buscó entonces diseñar una suerte de "*llave maestra*" capaz de acoplar con todas las formas polimórficas exhibidas por el virus, para lo cual se realizó la búsqueda de secuencias peptídicas con esta característica.

Identificación de péptidos con características de acople universal :

En ésta investigación se realizaron análisis estéricos y electrostáticos para identificar secuencias peptídicas capaces de acoplar simultáneamente con todos los subtipos de HLA-2. Los resultados obtenidos indicaron que los péptidos de poli-Gli son los únicos capaces de generar un acople espacial óptimo con todos los 20 aminoácidos con que se pudieran aparear. Resultados análogos se obtuvieron con matrices de apareamiento electrostático: los péptidos de poli-Gli también clasificaron entre los 10 poli-aminoácidos capaces de aparear todo tipo de cargas eléctricas y momentos dipolares. Se concluye entonces que las Glicinas son los únicos aminoácidos con la versatilidad espacial y electrostática necesaria que deben ser incluidos en el diseño de la vacuna, de modo que los anticuerpos inducidos por este modelo de vacuna poseerán mucha mayor versatilidad entrópica para adaptarse a la topología y a las polaridades de los epítopes del patógeno (33,96). La tabla (3) muestra la diferencia en la activación de anticuerpos entre las vacunas convencionales y el modelo de vacuna aquí propuesto. Las vacunas convencionales inducen la producción de anticuerpos monoclonales con capacidad para reconocer un único epítope sin polimorfismo de contexto, mientras que el modelo propuesto por los autores induciría un variado repertorio de anticuerpos policlonales capaces de reconocer todas las variaciones existentes en el contexto molecular de las dianas del patógeno.

Tabla 3 : Esquema de activación de anticuerpos por vacunas convencionales y por el modelo de vacuna propuesta en esta investigación.



En la tabla (3) se muestra que en una vacuna convencional compuesta por un epítipo de 3 aminoácidos con carga eléctrica, se induce la producción de un solo anticuerpo monoclonal. Por su parte, en el modelo de vacuna propuesta por los autores se induce la producción de múltiples anticuerpos capaces de reconocer todas las formas polimórficas exhibidas por el virus.

En base a los resultados anteriores se propuso entonces el siguiente modelo de péptido-vacuna presentado en la figura (22).

Las características funcionales de este modelo son las siguientes :

- Los residuos 1 al 20 acoplan en la molécula CMH-2 de las células presentadoras de antígeno.
- Los residuos 8 al 15 son identificados por los marcos de lectura de los anticuerpos.
- Los residuos 14, 12, 8, activan los receptores TCR.
- Los residuos 18, 15, 13, 10, acoplan en los bolsillos de anclaje de la CMH-2.
- El residuo 18 tendrá doble función : anclaje al P1 del CMH y función de fosforilación durante la digestión proteolítica.
- Los residuos 4 al 7 y 16 al 20, tendrán función exclusiva de acople espacial al CMH, formando puentes de hidrógeno peptido-CMH.
- Los residuos 23 al 42 tienen como función estabilizar la cadena funcional del péptido mediante puentes de hidrógeno.

Energética de activación inmunitaria (fuerza de acople a los TCR) :

La inmunogenicidad de un epítipo depende de la forma en que ocurren sus registros de enlace a la CMH-2 y de la energética de activación de este epítipo sobre el TCR, de manera que es necesario elegir la secuencia peptídica que cumpla adecuadamente estas dos condiciones.

Figura 23 : Molécula de CMH-2

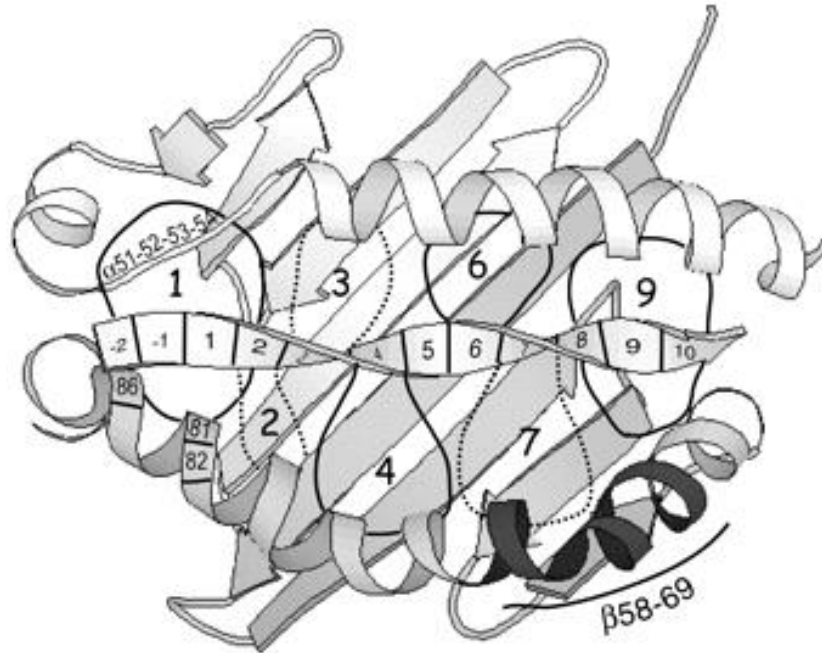


Tabla 4 : Estructura de los compartimentos de la molécula HLA-2

P1		TCR	P4	TCR	P6	TCR		P9		TCR
Bolsillo Grande			Bolsillo Pequeño		Bolsillo Pequeño			Bolsillo Grande		

*Los epitopes T2 y T3 fueron sintetizados y sometidos a análisis de activación inmunitaria en el laboratorio FIDIC. Como resultado se obtuvo que el epitope T2 indujo una producción de IL-2 muy baja, en una cantidad de 0.108 units/ml lo cual lo hace muy poco inmunogénico. Por su parte, el epitope T3 indujo un nivel de IL-2 bastante alta de 10,000 units/ml, demostrando con esto su alta inmunogenicidad (105). Los autores del presente trabajo explicamos estos resultados con los valores de energía de activación del TCR en la tabla 5: T2 con 1.0 Kjul/mol y T3 con 3.5 Kjul/mol. Con esto se muestra la relación directa entre la energía de activación del TCR y la inmunogenicidad de los péptidos.

En las tablas 6 y 7 se muestran las diferentes secuencias candidatas como peptido-vacuna, a partir de lo cual se eligen las mas adecuadas, que son las que generan acoples más energéticos con los receptores TCR. Observando las tablas 6 y 7 se encuentra que el mejor epitope-vacuna candidato para $\beta 20$ es la secuencia #8 con una energética inmunogénica (de acople al TCR) de 3.0 Kjul/mol. Por su parte, el mejor candidato para $\beta 23$ es la secuencia #3 con una energética inmunogénica de 2,5 Kjul/mol.

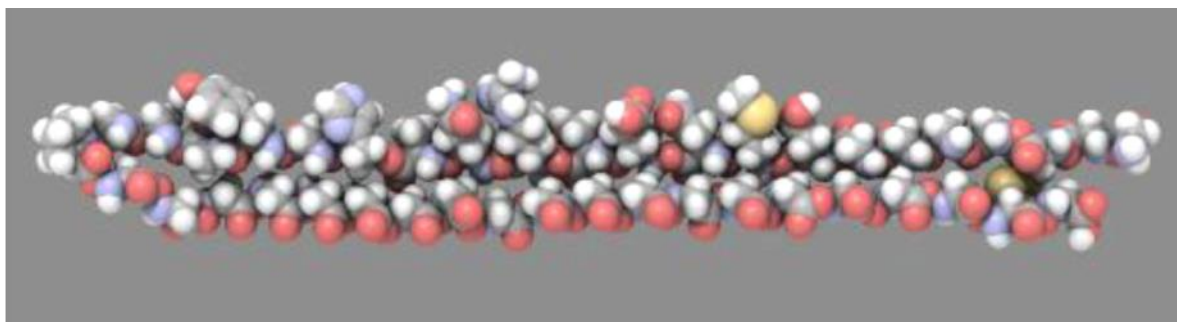
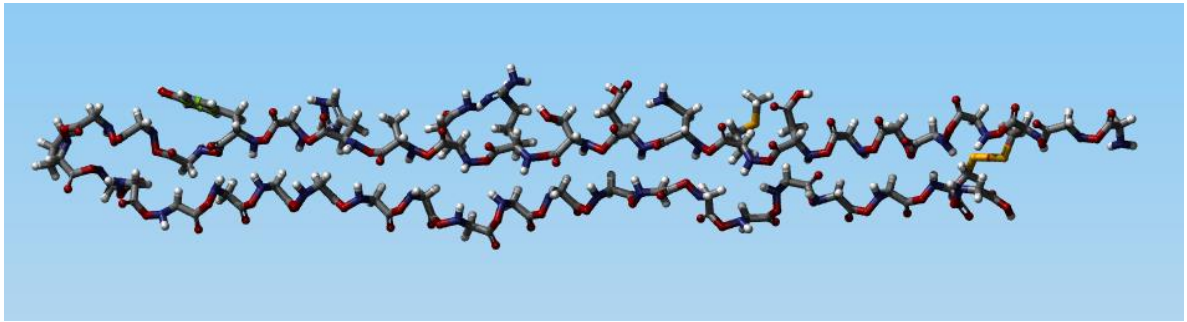


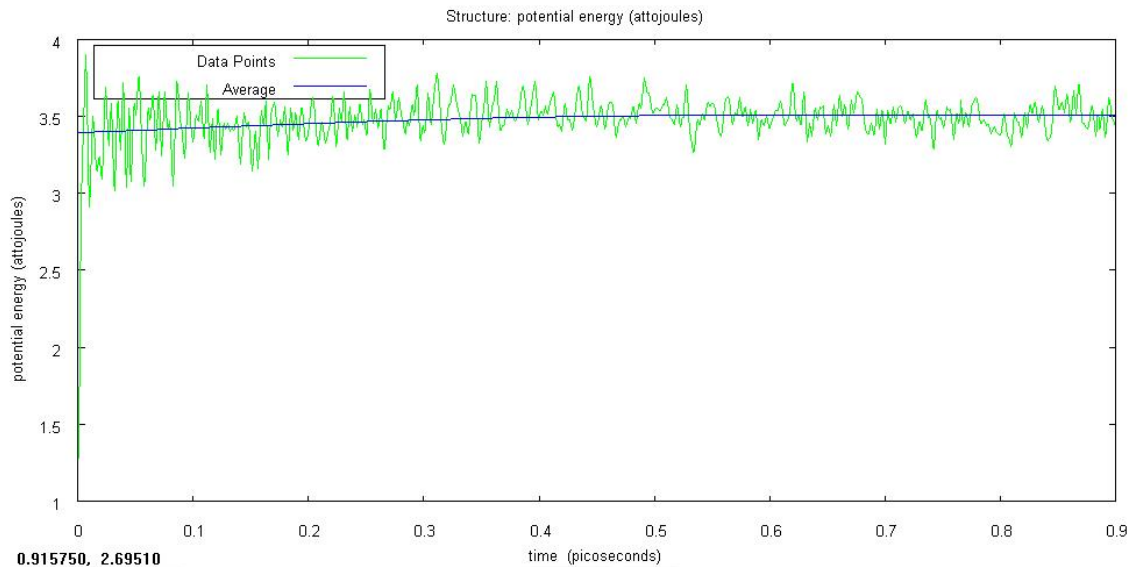
Figura 25. Estructura terciaria del péptido vacuna candidato en NE1



*estructura terciaria del péptido candidato a vacuna, este se encuentra en su estado de mínima energía.

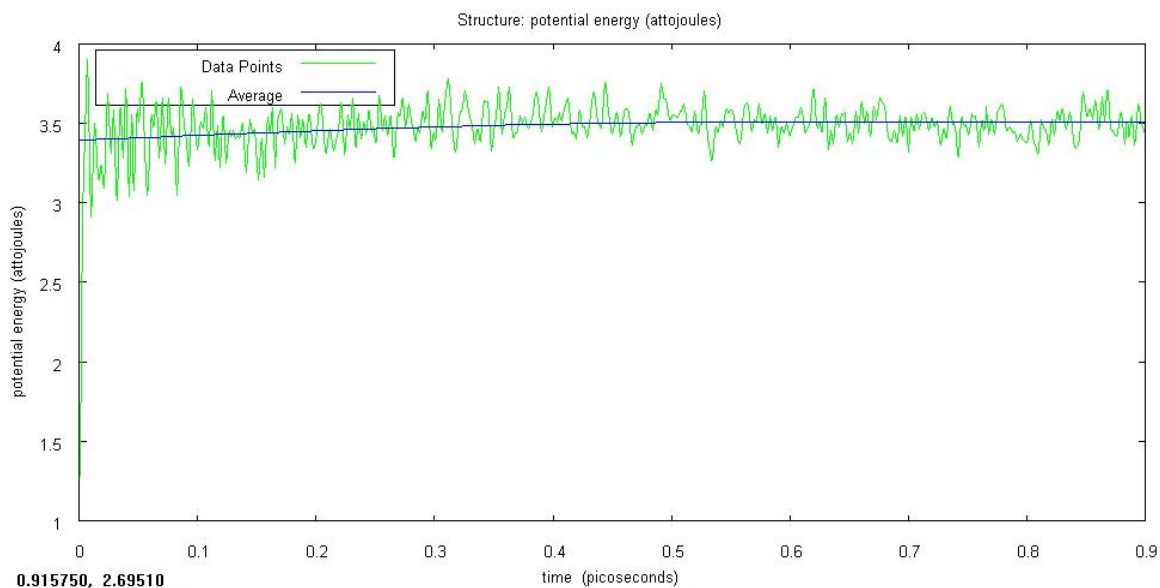
Graficas de distribución de energía

Figura 26. Energía potencial en attojulios



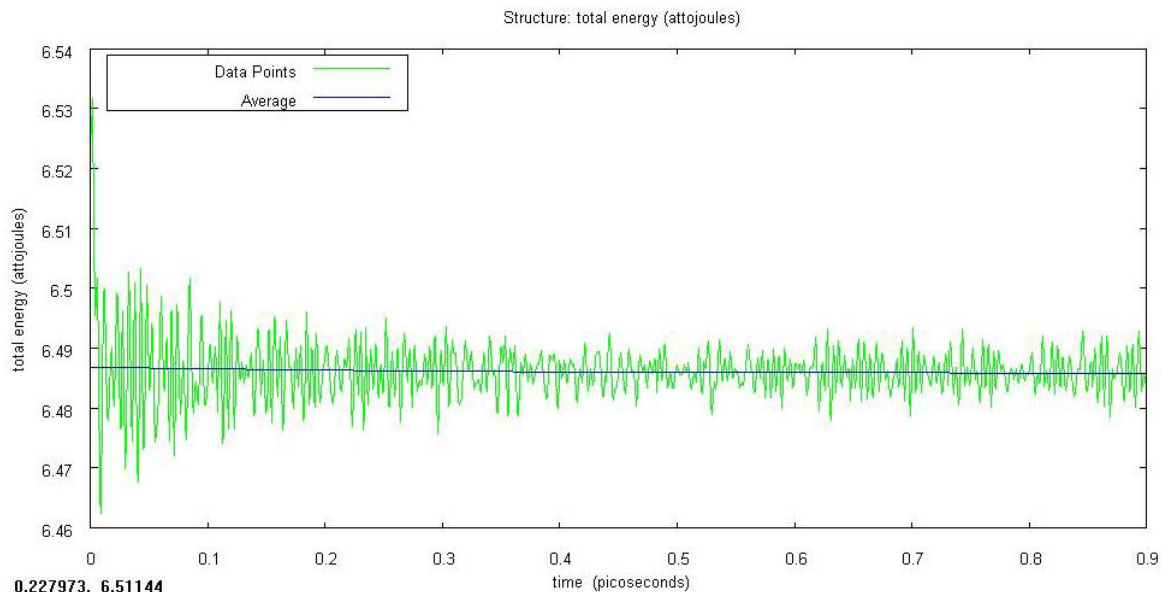
*Al inicio de la simulación la energía potencial se inicia con un valor alto con una progresiva migración de valores respecto al tiempo con tendencia a minimizarse, la energía potencial muestra la progresión del péptido a un estado de menor energía lo cual indicó la existencia de estabilidad en el péptido.

Figura 27. Energía cinética en attojulios



*La grafica de energía cinética muestra una migración progresiva del péptido modelado al equilibrio, sin embargo se observa alta frecuencia de picos de cambio en la energía, es decir que el péptido presenta alta movilidad, debido probablemente a la poca restricción estérica que tienen las glicinas, sin embargo el péptido se mantiene estable por la aparición de puentes de hidrogeno estabilizantes entre cadenas.

Figura 28. Energía total en attojulios



*La sumatoria de energía cinética más energía potencial dan como resultante la trayectoria de la energía total. La energía cinética y la potencial se encuentran en un intervalo de 3.41 attojulios, por lo tanto casi se cancelan, lo cual sugiere la relativa estabilidad del péptido modelado.

Para las simulaciones, las funciones de energía potencial son determinadas por GROMACS; este utiliza diferentes algoritmos para ajustar el campo de fuerza del modelo que simulamos, el realiza la solución de las ecuaciones del movimiento de Newton para este sistema el cual es de muchas partículas. Las energías tanto cinética como potencial son muy similares, al punto que casi se cancelan, lo cual sugiere la estabilidad relativa del péptido. El péptido obtiene estabilidad de la dinámica propia de su estructura en correlación con el medio en el que se encuentra, es decir que el péptido candidato en el sistema de modelación se encuentra estable, sin embargo no se pudieron realizar simulaciones en diferentes campos de fuerza, esto debido solo a que no disponemos de gran capacidad de cálculo. El coeficiente de energía estérica para el péptido modelo en su estado de mínima energía fue de 23.81 Kcal/mol. Esta energía es variable dependiendo del potencial en el cual se ejecute la simulación.

7. DISCUSIÓN

A continuación se realizara una discusión de los aspectos más relevantes para la construcción del modelo del péptido vacuna candidato, esta discusión se organizo por puntos sobre cada uno de los detalles críticos a actuar de la vacuna.

Co-receptor celular CCR5 Y CXCR4:

El acople del virus a la molécula CCR5 es absolutamente necesario para la entrada del virus a la célula, lo cual indica que la molécula CCR5 es una proteína de fusión virus-célula, por esta razón la vacuna diseñada bloquea también el acople del virus a este co-receptor. El co-receptor celular CCR5 se acopla al segmento viral $\beta 20$ lo cual justifica la inclusión de este péptido en el diseño de la vacuna. Esta sugerencia es apoyada por las siguientes observaciones experimentales: Pacientes que poseen los dos alelos CCR5 en su forma mutada (Pacientes homocigóticos mutantes) poseen una inmunidad absoluta contra la infección por VIH (60, 71).

Mimetismo Molecular:

El VIH tiene epitopes de adhesión constantes, pero el contorno molecular, el contexto molecular de esos epitopes es lo que varía constantemente, por lo cual los anticuerpos que el cuerpo produce son ineficaces contra ellos. A esto se lo puede llamar "polimorfismo molecular del contexto". Para resolver este problema, los autores proponemos que es necesario inducir la producción de anticuerpos diversos que reconozcan todos los posibles contornos físicos de los epitopes de adhesión (102).

Si el VIH tuviera todos sus epitopes de adherencia juntos, en secuencia, sería muy fácil para un anticuerpo reconocerlos porque tendrían energía suficiente para inducir una activación inmunitaria. Entonces lo que hacen los microorganismos es fragmentar sus epitopes de adherencia y distribuirlos por regiones dispersas para evitar que no se alcance la densidad energética suficiente para desencadenar una respuesta de anticuerpos neutralizantes. Es decir que el acople microorganismo-célula depende de la sumatoria total de energía de adherencia de los epitopes individuales, lo cual le permite también alternar la activación secuencial de estos epitopes para adherirse a las células, como un mecanismo adicional a la evasión inmunitaria. Esto representa un mecanismo de "Transición de Fase": o infecta o no infecta, dependiendo de si la energía de acoplamiento alcanza o no un valor

crítico. A mayor número de epitopes de adherencia que posea el microorganismo tendrá mayores posibilidades de conmutación de sus epitopes para lograr la adherencia. Esto delata un mecanismo de "correlación" que abarca al sistema entero, el cual funciona solamente si la "ENERGÍA TOTAL" alcanza el valor crítico. Por su parte los epitopes seleccionados como candidatos para la vacuna, el $\beta 20$ y el $\beta 23$ no poseen la energética suficiente para inducir la producción de anticuerpos neutralizantes (91).

Los epitopes mas conservados resultan tener un "código de silencio", esto significa que estos antígenos no inducen la producción de anticuerpos neutralizantes. Patarroyo y *et al* buscaron resolver este problema convirtiendo los péptidos no-inmunogénicos en sí-inmunogénicos mediante dos métodos: 1) sustituyendo residuos de aminoácidos por otros de polaridad contraria y 2) Sustituyendo residuos por otros de quiralidad contraria. Sin embargo, con esta metodología empleada, Patarroyo no ha logrado aún resolver el problema de inducción de anticuerpos protectores contra *P. Falciparum* (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

Una región de reconocimiento en un patógeno se compone de: Epitope+Contexto, de modo que si el epítape es de adhesión y es conservado entonces su polimorfismo de evasión depende exclusivamente de la variación del contexto. El contexto debe generar más atracción que repulsión, al igual que un sistema de vidrios de spin: si la proporción de cargas repulsivas es mayor que las fuerzas de atracción se genera un sistema frustrado, por lo cual no habrá acople. Por lo tanto, para que el sistema no se convierta en frustrado, el contexto molecular debe variar dentro de un atractor energético que le permita conservar su funcionalidad: un potencial neto repulsivo frustra el sistema, al igual que una incompatibilidad estérica neta también frustra el sistema. El "contexto molecular" es un sistema indeterminado que varía dentro de un atractor energético para garantizar el acople virus-célula.

De todo lo anterior los autores concluimos que los epitopes constantes del VIH no inducen protección humoral por tres razones:

- 1) Porque la densidad energética de la región antigénica (por ejemplo sitios específicos de unión del patógeno infectante al hospedero), no alcanzan el umbral de activación energética necesaria para desencadenar una potente respuesta inmune. Por lo tanto estas regiones son invisibles para el sistema inmune o de muy baja inmunogenicidad.

- 2) Porque las zonas antigénicas constantes no son detectadas temprano debido a la "competencia electrostática" (fuerza polar de los otros epitopes) que generan los demás epitopes no neutralizantes.
- 3) Si llegan a ser detectados e inducen respuestas humorales estas respuestas no protegen durante mucho tiempo debido al polimorfismo del contexto.

CMH-II:

Encontramos que el único aminoácido que combina las dos características físicas de impedimento estérico nulo y neutralidad electrostática era la glicina, el cual sería el único aminoácido teóricamente capaz de amortiguar todo cambio espacial y eléctrico de su entorno, por lo cual tendrían características universales de acople con cualquier CMH-II y con capacidad de inducir anticuerpos protectivos contra cualquier forma polimórfica de VIH, por lo cual al ser incluidos en el diseño de la vacuna podría inducir en teoría una respuesta inmunitaria de amplio espectro (15).

Acople Péptido-Anticuerpo:

En este punto de la investigación extrapolamos los resultados obtenidos en la identificación de péptidos con acople óptimo a la CMH-II. Esto con el propósito de identificar un péptido con capacidad de acoplamiento universal a la mayoría de anticuerpos de reconocimiento y con esto induzca protección contra todas las formas polimórficas infecciosas de VIH-1. En esta labor se identificaron dos tipos de variables una dinámica y otra estática. En la variable dinámica se analizaron dos características en la sustitución de cada aminoácido: volumen estérico y carga eléctrica. Por su lado, la variable estática es el nivel energético mínimo para la activación inmunitaria de anticuerpos, cuyo valor se estimó en 6 Kjul/mol.

Existe una relación directa entre la fuerza del acople péptido-CMH con el tiempo de exposición del péptido y el grado de inmunogenicidad inducida: tiempos largos de exposición del complejo péptido-CMH están relacionados con inmunidades a más largo plazo. Con el modelo propuesto por los autores se está garantizando la formación de más puntos de contacto péptido-CMH, con un consecuente incremento en los tiempos de acople y presentación del péptido. El modelo de

vacuna propuesto aquí en su forma dimerizada ocasiona la formación de complejos de HLA dimerizados los cual duplicaría las energías de acople (22) incrementando con esto los niveles de activación de los lincecitos T-helper.

Los epitopes largos tienen varios marcos de lectura de anticuerpos, porque los Ab no tienen ninguna restricción de lectura sobre el péptido, mientras que el acople péptido-CMH para péptidos largos tiene menos marcos de acople por la gran restricción que generan los extremos de la CMH. Entre más extenso sea un péptido, su topología energética va a ser más exclusiva y entre más corto sea, su topología va a ser más compatible (va a encajar) con más sitios en la CMH, lo cual genera competencia antigénica porque el TCR va a tener varios marcos de lectura diferentes para leer (esto podría generar sistemas frustrados, si el macrófago está exhibiendo múltiples complejos en su superficie, pero con diferentes marcos de acople) esto incrementaría la diversidad de acoples, por lo cual el uso de péptidos largos (de muchos AA) puede reducir su inmunogenicidad.

El principal factor de estabilización del complejo péptido-CMH son los Puentes de Hidrogeno (93). Estos péptidos son presentados en forma extendida en el CMH y son "leídos" en forma ortogonal por el TCR, es decir, que el TCR hace una lectura de la secuencia lineal del péptido, esto significa que el complejo péptido-CMH tiene una función exclusivamente FÍSICA de acople del péptido, mas NO inmunológica. La función inmunológica la cumple el TCR haciendo una lectura lineal del péptido. Esto significa que para garantizar la inmunogenicidad de un péptido, bastan dos cosas:

- Un acople FÍSICO del péptido con el CMH
- una secuencia lineal sin homología con las secuencias lineales del paciente.

A su vez, la activación de los linfocitos T-helper que están leyendo el epitope ortogonal, depende de la fuerza coulombica con que se acople al péptido.

8. CONCLUSIONES

- Si es posible construir un modelo de péptido sintético que sea candidato a vacuna contra VIH, mediante el uso de modelado 3D CAD y simulación de su dinámica molecular con NE1 y GROMACS+HDF5. Lo cual se presenta como una gran alternativa, al utilizar ingeniería de proteínas, en combinación con herramientas propias de la nanotecnología, para la construcción y modelado de péptidos sintéticos en búsqueda de generar respuestas inmunológicas potentes y específicas con potenciales fines clínicos, además de posiblemente ser extensible esta innovación a cualquier otro patógeno viral o bacteriano que cumpla con ciertos requerimientos.
- El péptido vacuna candidato se presenta en su estado de mínima energía, este estado se obtuvo tras la reducción de energía con GROMACS, el estado de mínima energía muestra al péptido modelo candidato como estable, la aparición de puentes de hidrógeno intercatenarios agregan estabilidad al péptido modelado, El coeficiente de energía estérica para este péptido modelo fue de: 99.52 Kj/mol.
- El modelo de vacuna propuesto pretende ser un tipo de vacuna universal capaz de inducir inmunidad contra todas las formas polimórficas infecciosas del virus VIH, además de poseer propiedades antigénicas e inmunogénicas mejoradas, estructura tridimensional única y estable, largo tiempo de vida en sangre, evita la competencia antigénica, inducir respuestas protectoras precoces evitando la diversificación antigénica del patógeno infectante, induce memoria inmunitaria a largo plazo y acopla de forma óptima en las moléculas presentadoras de antígeno.
- Es absolutamente necesario activar una respuesta inmunitaria preventiva mediante vacunación contra los epitopes constantes antes de que la diversidad antigénica del patógeno supere la complejidad de respuesta del sistema inmunitario. Si la respuesta inmunitaria inicial ante los epitopes conservados es contundente, la eficiencia del ataque defensivo contra el VIH también sería contundente. (competencia antigénica y agotamiento de los repertorios protectores de inmunoglobulinas). Esto es alcanzado por el modelo de vacuna propuesto ya que se atacan dos epitopes altamente conservados en el virus. El primer mecanismo de acción de la vacuna anti-

VIH candidata propuesta, consiste en inducir un cambio conformacional en la gp120 con el cual quedan expuestos los epitopes de acople al CCR5. El segundo mecanismo de acción de la vacuna consiste en el bloqueo de los epitopes recién exhibidos por la gp120 (65), con lo cual se garantizaría la protección contra todas las formas del patógeno infectante.

- Es imposible probar la efectividad total del modelo obtenido solamente por métodos computacionales, se hace imperativo la síntesis en húmedo del péptido y su correspondientes caracterizaciones mediante espectroscopias y las posteriores pruebas in vitro e in vivo de la vacuna.

9. RECOMENDACIONES

El modelado computacional de proteínas es una tecnología que está creciendo al mismo ritmo con el que crece la tecnología computacional en la que se sustenta. En la actualidad la física nos aporta herramientas matemáticas muy eficientes para construir y validar estos modelos, sin embargo dada la complejidad de las proteínas es aún muy costoso en tiempo de procesamiento el llevarlos a cabo. Las alternativas que se presentan es el abordaje por técnicas de la física clásica o semi-clásicas como la DM, ya que la física cuántica para estos modelos solo es una realidad cuando se disponen de enormes recursos económicos y de las más poderosas computadoras del planeta, nuestra sugerencia la adquisición de un clúster de alto procesamiento por la Universidad del Cauca, ya que cada vez las universidades colombianas requieren más de equipos de alta tecnología para poder hacer realidad visiones como la plasmada en este trabajo, la cual requiere de mucha potencia de cálculo para su desarrollo.

Este trabajo dada su naturaleza teórica, representa una alternativa muy importante para el desarrollo de vacunas sintéticas, sin embargo se hace necesario la síntesis en húmedo del péptido modelo candidato, para verificar las características esperadas en el modelo y así validar los resultados obtenidos, nuestra recomendación es llevar a cabo la síntesis en fase sólida del péptido modelo y su caracterización por técnicas espectroscópicas.

BIBLIOGRAFÍA

1. ABBAS, A. LICHTMAN, A. Inmunología celular y molecular. España: McGraw Hill Interamericana : 2005.
2. ACADEMIA COLOMBIANA DE CIENCIAS EXACTAS, FISICAS Y NATURALES. Archivos de coordenadas moleculares PDB. [Pagina web oficial]. [consultado septiembre de 2007]. Disponible en www.accefyn.org.co/rasmol/pdb.htm.
3. AFANI, A., Vacunas anti-VIH. Conferencia Hospital Clínico Santiago de Chile, 2007
4. AKERBLUM, L. INCULA, J. BROLIDEN, P. MAKITALO, B. FRIDBERGER, T. Neutralizing cross-reactive and non-neutralizing monoclonal antibodies to HIV-1 gp120. AIDS 4:954-960.
5. ALDER, B. J. WAINWRIGHT, T. E. Studies in molecular dynamics. I. General method. Journal Chemical Physical. 31, 459-466 : 1959
6. ANIA. El VIH/SIDA es todavía la primera causa de muerte en África. [Pagina web de la Agencia de Noticias de Información Alternativa]. [consultado septiembre de 2007]. Disponible en <http://ania.urcm.net/noticia.php3?id=23665> : 2007
7. BACHMANN, M., KUNDIG, T., KALBERER, C. How Many Specific B Cells Are Hended to Protect Against a Virus?. Journal of Immunology. 1994. 152 : 4235-4241
8. BADENAS, F. G. Métodos computacionales de modelado molecular y diseño de fármacos. Departamento de Fisiología y Farmacología, Universidad de Alcalá de Henares, Madrid : 2000.
9. BBC mundo. ¿Imposible hallar una vacuna contra el VIH?. [base de datos en línea]. [consultado 16 de febrero de 2008]. Disponible en: http://news.bbc.co.uk/hi/spanish/science/newsid_7246000/7246233.stm
10. BERNSTEIN, H.J., Guide RasMol ver 2.7.3, [Pagina web oficial del creador]. [consultado Julio de 2007]. Disponible en <http://130.95.232.101/iucr-top/cif/software/rasmol/doc/rasmol.html>
11. Binding of peptides to an MHC class II protein for competition with autoimmune-disease epitopes.
12. BORRÁS-CUESTA F, PETIT-CAMURDAN A, FEDON Y. Engineering of immunogenic peptides by collinear synthesis of determinants recognized by B and T cells. Eur J Immunol 1987; 17: 1213-1215.
13. BORRELI, R. COLEMAN, C. S. Ecuaciones diferenciales Una perspectiva de modelación. Oxford University Press, Mexico. 2002 ; 1ª Ed. P 821

14. BROWN, J. JARDETZKY, T. Three-dimensional structure of the human class II histocompatibility antigen HLA-DR1., *Nature* Vol 364,1993.
15. BUTEAU, C. MARKOVIC, S. AND CELIS, E. Challenges in the Development of Effective Vaccines for Cancer. *Mayo Clin. Proc.* 77: 2002.
16. CALVO, J., MARTINEZ, J., PATARROYO, M. E.. De la predicción al Análisis Antigénico: Tras las huellas de un Epitope Conformacional. *Academia Colombiana de Ciencias.* 2003. 102 : 133-140
17. CALVO, J., RIVERA, Z., CARVAJAL, C., BERNAL, A., PATARROYO, M.E. Síntesis de Péptidos Dendrimericos Usando la Estrategia de Doble Dímero. *Revista Colombiana de Química.* 1999. 28,1.
18. CANO, N. MONTOYA, C. Las quimioquinas: citoquinas proinflamatorias y reguladoras del tráfico celular. *IATREIA / VOL 14/No.1/ MARZO / 2001*
19. CASTRO, A. Adherence to antiretroviral therapy: Merging the clinical and social course of AIDS. *PLoS Med* : 2005 2(12): e338.
20. CHEN, C., ZHU, C.. Construction and Biological Function of the gp 120 Bridging Sheet. *Aids Vaccine.* 2001. 291 p.
21. CHICZ, R. URBAN, R. STROMINGER, J. Specificity and Promiscuity among Naturally processed Peptides Bound to HLA-DR Alleles.. *Exp. Med.* July 1993
22. CIFUENTES, G. ESPEJO, F. VARGAS, E. PARRA, C. VANEGAS, M. AND PATARROYO, M. Orientating Peptide Residues and Increasing the Distance between Pockets to Enable Fitting into MHC-TCR Complex Determine Protection against Malaria. *Biochemistry*, 43 (21), 6545 -6553, 2004.
23. COHEN O, WEISSMAN D, FAUCI AS. The immunopathogenesis of HIV infection. En: Paul WE, editor. *Fundamental Immunology.* 4th. edition. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers; 1999. p.1455-98.
24. CULSHAW, R. V. ¿VIH / SIDA? ¿Por qué abandono el VIH? [Pagina Web]. [consultado enero de 2007]. Disponible en <http://www.lewrockwell.com/orig7/culshaw1.html>
25. DEWITTE R. S., MICHNICK S. W., SHAKHNOVICH E. T., Exhaustive enumeration of protein conformations using experimental restraints. *Protein Science.* 1995 4: 1780-1791
26. DOBSON, C. Protein Misfolding, Evolution and Disease. *Trends in Biochem. Sci.* Vol. 24.1999.
27. EIGEN, M.. Cuasiespecies Víricas. *Investigación y Ciencia.* 1993
28. ELENA, S. Evolución y Adaptación de los Virus de ARN. *Investigación y Ciencia.* 2002.
29. ESTUPIÑAN, S. M., TRUJILLO, E. Complejo mayor de histocompatibilidad y el desarrollo de vacunas. *NOVA* : 2004.Vol 2 (2) p 59-70.

30. FOUTS, T.R. TUSKAN, R. GODFREY, K. et al. Expression and characterization of a single-chain polypeptide analogue of the human immunodeficiency virus type 1 gp120-CD4 receptor complex. JOURNAL OF VIROLOGY 74: 11427-11436
31. EZZELL, C. Vacunas contra el Sida. American Scientific. Agosto 2002.
32. FLOREA, L. HALLDORSSON, B. KOHLBACHER, O. Epitope Prediction Algorithms for Peptide-based Vaccine Design. Proceedings of the Computational Systems Bioinformatics.
33. FREEMAN, W.H. Book. Proteins: Structure and Molecular properties (2nd ed.)
34. GLAXOSMITHKLINE. About Swiss-PdbViewer/DeepView [Programa de visualización de proteínas versión 3.7]. [consultado agosto de 2007]. Disponible para descarga gratuita en www.expasy.org/spdbv/
35. GOMEZ-MORENO, C., SANZ, J. S., Estructura de proteínas, Ariel Ciencia, 1ª Ed, Barcelona. 2003. P 567.
36. GREENE, W. AIDS and the immune system. Scientific American, Inc. 1993.
37. GREINER, W. NEISE, L. STOCKER, H. Thermodynamics and statistical mechanics. New York: Springer-Verlag Inc. : 1997
38. GUEVARA, M. E. Herramientas para el análisis de secuencias, Boletín VRI, Universidad del Cauca, Abril 2006 Pag. 15
39. GUPTA, S., FERGUSON, N., ANDERSON, R. Chaos, Persistence, and Evolution of Strain Structure in Antigenically Diverse Infectious Agents. Science. 1998. 280 : 912-915
40. HAILE, J. M. Molecular dynamics simulation. United States: Wiley Professional Paperback : 1997
41. HERVÁS-STUBBS S, BERASAIN C, GOLVANO JJ, LASARTE JJ, PRIETO I, SAROBE P et al. overcoming class II-linked nonresponsiveness to hepatitis B vaccine. Vaccine 1994; 12: 867-871.
42. HERVÁS-STUBBS, S. RODRÍGUEZ, M. LASARTE, J.J. RIEZU, J.I. BERASAIN, C. PRIETO, J. BORRÁS-CUESTA F. Péptidos sintéticos para la inducción de una respuesta inmune humoral y celular contra el virus de la hepatitis B y el tipaje del virus de la hepatitis C. ANALES Sis San Navarra 1999, 22 (Supl. 3): 93-102
43. HIV Molecular Immunology 2006: Maps of Ab Epitope Locations Plotted by Protein, Theoretical Biology & Biophysics, Los Alamos National Laboratory July 31, 2008 [base de datos en línea]. [consultado Agosto 10 de 2008]. Disponible en: <http://www.hiv.lanl.gov/content/immunology/maps/ab/ab.pdf>
44. IAVI Types of HIV vaccines. [Iniciativa internacional para el desarrollo de vacunas anti-VIH] [consultado 25 jun. 2006] <http://www.iavi.org/viewpage.cfm?aid=1689>
45. IAVI. AIDS vaccine blueprint, 2006. A partner of the Global HIV Vaccine Enterprise.

46. IRBACK, A. PETERSON, C. AND POTTHAST, F. Identification of Aminoacid Sequences with good holding properties in an off-lattice model. *Physical Review E*. Vol. 55 No1.1996.
47. JENSEN, P.E.; WEBER, D. A.; THAYER, W. P.; WESTERMAN, L. E. Peptide exchange in MHC molecules. *Immunological Reviews*. 1999. 172 : p 229–238
48. JURADO, A., HERRERO, M^a.J. Vacunas de ADN en el tratamiento de la alergia, *AVANCES PEDIÁTRICOS, BSCP Can Ped*; 25– nº 1. 2001
49. KAUFFMAN, S.. Anticaps y Adaptación. *Investigación y Ciencia*. 1992.
50. KOEHL, P. AND LEVITT, M. De Novo Protein Design. II. Plasticity in sequence Space. *Journal of Molecular Biology* (1992) 293, 1183–1193.
51. KORTEMME, T., RAMÍREZ, M., SERRANO, L. Design of a 20+/- Aminoacid, Three-Stranded β -Sheet Protein. *Science*. 1998. 281: 253–256
52. KROGSTAD, P. Molecular biology of the human immunodeficiency virus: current and future target for intervention. *Semin Pediatr Infect Dis*. 2003. 131 (3) : 258–68.
53. KWONG, P, D. SODROSKI, J. WYATT, R. et al. Structural definition of a conserved neutralization epitope on HIV-1 gp120. *Nature*. 2007 Feb 15;445(7129):732–7.
54. KWONG, P. DOYLE, M. WYATT, R. SODROSKI, J. HENDRICKSON. W. HIV-1 evades antibody -mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature*, December 2002.
55. KWONG, P., WYATT,R., DESJARDINS, E. Structure of an HIV gp 120 envelope glycoprotein. *Nature*. 1998. 393 :701–711
56. KWONG, P., WYATT,R., ROBINSON,J. Structure of an HIV gp 120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 1998. 393 : 648–659
57. LABRIJIN A., P. POIGNARD, A. RAJA, M. ZWICK, K. DELGADO. Access of Antibody Molecules to the Conserved Coreceptor Binding Site on Glycoprotein gp120 Is Sterically restricted on Primary Human Immunodeficiency Virus Type 1. *JOURNAL OF VIROLOGY*, Oct. 2003, p. 10557
58. LASARTE JJ, SAROBE P, GULLÓN A, PRIETO J, BORRÁS-CUESTA F. Induction of cytotoxic T lymphocytes in mice against the principal neutralizing domain of HIV-1 by immunization with an engineered Tcytotoxic-T-helper synthetic peptide construct. *Cell Immunol* 1992; 141: 211–218.
59. LETVIN, N.. Progress in the Development of an HIV-1 Vaccine. *Science*. 1998. 280 : 1875–1879

60. LIU. R. Homozygous Defect in HIV-1 co-receptor Accounts for resistant of some Multiply-Exposed Individuals to HIV-1 Infection. Cell Vol. 86 No 3 Aug.1996
61. MANDELBROT, B. The Fractal Geometry of Nature. New York. 1982.
62. MENÉNDEZ, A., ZWICK, M., BONNYCASTLE, L., IRVING, M., MONTERO, M. A peptide that Specifically Binds the Broadly HIV-1-Neutralizing, Human Antibody, b12. Aids Vaccine. 2001.
63. MONTERO, L.A., ESTEVA, A.M., MOLINA, J., ZAPARDIEL, A., HERNÁNDEZ, L., MÁRQUEZ, H., ACOSTA, A., "A Theoretical Approach to Analytical Properties of 2,4-Diamino-5-Phenylthiazole in Water Solution. Tautomerism and Dependence on pH", J. Am. Chem. Soc., 120, 12023, (1998).
64. MONTOYA, J. C., MORENO, M.E., RUGELES. M. T. Reacciones y alteraciones del sistema inmune durante la infección por VIH-1. Infectio : 2006. 10(4) : 250-256.
65. MOORE, J. AND BINLEY, J. Envelope`s letters boxed into shape. Nature Vol. 393, Jun. 1998.
66. MOULT, J. HUBBARD, T. Critical Assessment of Methods of protein Structure Prediction. Proteins Vol. 45, 2001.
67. MULTIPLE REPORT. Casp 7. Critical Assessment of Techniques for Protein Structure prediction. Asilomar conference center pacific grove, california. november 26-30, 2006
68. MYSZKA. D. G., SWEET, R. W., HENSLEY, P., et al. Energetics of the HIV gp120-CD4 binding reacting. PNAS : 2000. vol 97;16. 9026
69. National Institute of Health AIDS Research and Referente Reagent Program [Base de datos en línea] [consultado en abril de 2007] disponible en www.aidsreagent.org.
70. NAVIA, B.A., JORDAN B.D., PRICE R.W. The AIDS dementia complex, I clinical features. Annual Neurology. 1986 : 19:517-24.
71. O`BRIEN, S. AND DEAN, M. Genes que oponen resistencia al Sida.. American Scientific. Dic. 1997.
72. OLLMANN, E. et al. Crystal Structure of a Neutralizing Human IgG Against HIV-1: A Template for Vaccine Design Science. 2001 : 293, 1155.
73. OMS, La escasez de inversiones en inmunización y vacunas amenaza la salud mundial, Informe mundial sobre la situación en vacunas, [base de datos en línea]. [consultado 30 Agosto de 2007]. Disponible en <http://www.who.int/entity/mediacentre/events/report/es/index.html>.
74. PATARROLLO, M. E., et al. A synthetic vaccine protects humans against challenge with asexual blood stages of Plasmodium falciparum malaria. Nature 1988; 332; 10: 158-161.

75. PATARROLLO, M. E., et al. Induction of protective immunity against experimental infection with malaria using synthetic peptides. *Nature* 1995 : 328: 629–32
76. PATARROYO, M. ALBA, M. VARGAS, L. SILVA, Y ROSAS, J. RODRIGUEZ, R. Peptides inducing short-lived antibody responses against *Plasmodium falciparum* malaria have shorter structures and are read in a different MHC II functional register *Biochemistry* 2005, vol. 44, no18, pp. 6745–6754.
77. PATARROYO, M. CIFUENTES, G. BERMUDEZ, A. PATARROYO, M. A. Strategies for developing multi-epitope, subunit-based, chemically-synthesized antimalarial vaccines. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*.
78. PATHRIA, R. K. *Statistical mechanics*. 2ed. Great Britain: Hartnolls Ltda. 1996.
79. PEIPERL, L. Where's the AIDS Vaccine?, *Abril de 2003*
80. PLANZ, O. ZINKERNAGEL, R. Specific Cytotoxic T cells eliminate cells producing neutralizing antibodies., *Nature: Vol 382 No:22 1996*
81. POON, B. SAFRIT, J. T. MCCLURE, H., et al. Induction of Humoral Immune Responses following Vaccination with Envelope-Containing, Formaldehyde-Treated, Thermally Inactivated Human Immunodeficiency Virus Type 1. *Journal of Virology*, *Abril. 2005*, p. 4927–4935
82. REGENMORTEL, V. Transcending the Structuralist Paradigm in Immunology – Affinity and Biological Activity Rather than Purely Structural considerations Should Guide the Design of Synthetic Peptide Epitopes. *Biomedical peptides, Proteins and Nucleic Acids*. 1(3) : 1995. p 108–116
83. REINHERZ, E. TAN, K. KERN, P. WANG, J. The cristal structure of a T Cell Receptor in Complex with Peptide and MHC Class II. *Science*, Vol. 286, Dec. 1999
84. ROBINS A; FREEMAN P. *Vacunas para el Tercer Mundo. Investigación y Ciencia*. 1999. 148 : 82–88.
85. ROHL, C., BAKER, D., STRAUSS, C. E., MISURA, K. M. Protein Structure Prediction Using Rosetta. *Numerical Computer Methods. Methods in enzymology*, Vol 383 : 2004
86. RUBINSTEIN, A.; Goldstein, H.; et al. Safety and immunogenicity of a V3 loop synthetic peptide conjugated to purified protein derivative in HIV-seronegative volunteers. *AIDS*. 1995. 9(3) : 243–51
87. RUDENSKY, A. PRESTON, P. Sequence analysis of peptides bound to CMH class II molecules.. *Janeway. Nature* 353: 622
88. SAPHIRE, E., PARREN, P., PANTOPHLET, R., ZWICK, M., MORRIS, G. Cristal Structure of a Neutralizing Human IgG Against HIV-1 : A Template for vaccine Design. *Science*. 2001. : 293 : 1155–1158
89. SATO, A., ZARUTSKIE, J., RUSHE, M., LOMAKIN, A., NATARAJAN, S. Determinants of the Peptide-induced Conformational

- Change in the Human Class II Major Histocompatibility Complex Protein HLA-DR1. *J. Biol. Chem.* 2000. 275 : 2165–2173
90. SOLA, J. et al. Genetic variability of HIV-1 in Navarra. *ANALES Sis San Navarra*, Vol. 22, Suplemento 3: 1999 p181–187 :
 91. SOLE, R. MANRUBIA, C. Complejidad en la frontera del caos., *American Scientific*. Mayo 1996.
 92. STANFIELD, R.L. GORNY, M.K. ZOLLA-PAZNER, S. WILSON, I.A. Crystal Structures of Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1) Neutralizing Antibody 2219 in Complex with Three Different V3 Peptides Reveal a New Binding Mode for HIV-1 Cross-Reactivity. *JOURNAL OF VIROLOGY*, June 2006, p. 6093–6105.
 93. STERN, J. AND WILEY, C. *Annu. Rev. Immunol.* 13, 587 (1995)
 94. TACK PC, BREMER JW, HARRIS AA, LANDAY AL, KESSLER HA, KURITZKES DR. Genotypic analysis of HIV-1 isolates to identify antiretroviral resistance mutations from source patients involved in health care worker occupational exposures. *JAMA*. 1999;281(12):1085–96.
 95. THALI, M. MOORE, J. FURMAN, C. CHARLES, M. HO, D. SODROSKI. J. Characterization of Conserved Human Immunodeficiency Virus Type 1 gp120 Neutralization Epitopes Exposed upon gp120-CD4 Binding. *JOURNAL OF VIROLOGY*, July 1993, p. 3978.
 96. THEODOSOPOULOS, T. THEODOSOPOULOS, P. Thermodynamic components of the affinity maturation of HIV neutralizing antibodies.
 97. TOP500 ORG. The 29th TOP500 List was released in Dresden Germany. [base de datos en línea]. [consultado 25 sep. 2007]. Disponible en <http://www.top500.com>.
 98. VALDEZ, H. AL-HARTHI L, LANDAY A, LEDERMAN MM. Rationale for immune-based therapies for HIV-1 infection. *J Lab Clin Med*. 1998;131(3):197–206.
 99. VARGAS, L, E. PARRA, C. SALAZAR, L. GUZMAN, F. PINTO, M. PATARROYO, M. MHC allele-specific binding of a malaria peptide makes it become promiscuous on fitting a glycine residue into pocket 6. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003, vol. 307, no1, pp. 148–156.
 100. VIGUERA, A.R. *Estructura y Estabilidad de las Proteínas*. Investigación y Ciencia. 2003.
 101. WASIMA, R., FAST, P., RODNEY, H., FLEMING, T. Intermediate-Size Trials for the evaluation of HIV Vaccine Candidates. *Ovid Technologies*. 16 (3) : 1997. p 195–203.
 102. WYATT, R. KWONG, P. DESJARDINS, E. ROBINSON. J. The antigenic structure of the HIV gp120 envelope glycoprotein.. *Nature* Vol 393 18 June.
 103. PATARROYO M, E. PATARROYO M, A. Emerging Rules for Subunit-Based, Multiantigenic, Multistage Chemically Synthesized Vaccines. *Acc. Chem. Res.*, 41 (3), 377–386, 2008. 10.1021/ar700120t

104. DORTA, M.J. SANTOVEÑA, A. OLIVA, A. LLABRES, M. FARIÑA, J.B. Influencia del pH y la temperatura sobre la estabilidad del péptido sintético antimalarico SPF66, en Memorias SEFIG feb, 2003.
105. PARRA C, M. CALVO, CAMERON T, PATARROYO M. E. Mayor Histocompatibility Complex and T cell Interactions of a Universal T Cell Epitope from *Plasmodium Falciparum* Circumporozoite Protein. J. Biol. Chem., Vol 281, Sigue 21, May 26 2006.