

T
1175

ATA SERVICIOS DE INFORMACION
ARCHIVO HISTORICO

124180



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

**“EMPLEO DE LA FRACCIÓN CROTÁLIDA AL27 COMO
FAVORECEDOR DE LA EXPRESIÓN DEL DNA EN UNA
VACUNA GÉNICA CONTRA LA RABIA”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

P R E S E N T A

Arcelia Alvarado Islas

COMITÉ TUTORIAL

TUTORES

Ángel Horacio Sandoval Trujillo

Álvaro Aguilar-Setién

ASESOR

Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez

MÉXICO D.F.

30 DE OCTUBRE 2006



EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA PERTENECE AL PADRÓN DE POSGRADOS DE EXCELENCIA DEL **CONACYT** Y ADEMÁS CUENTA CON APOYO DEL MISMO CONSEJO, CON EL CONVENIO **PPF-20-93**".

EL PRESENTE TRABAJO DE TESIS SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE EPIZOOTIOLOGÍA DEL CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DISCIPLINARIAS EN MICROBIOLOGÍA ANIMAL, PERTENECIENTE AL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES AGRÍCOLAS Y PECUARIAS (INIFAP); EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA DEL HOSPITAL SIGLO XXI, PERTENECIENTE AL INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL (IMSS); Y EN EL LABORATORIO DE PRODUCCIÓN DE BIOLÓGICOS, UBICADO EN LA UNIDAD XOCHIMILCO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA (UAM-X).

CON EL APOYO DE:

PROYECTO CONACYT-BIOTECNOLOGÍA Z006

PROYECTO CONVOCATORIA INIFAP 2002, PRECI 4212941P.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud

De las Unidades Iztapalapa y Xochimilco

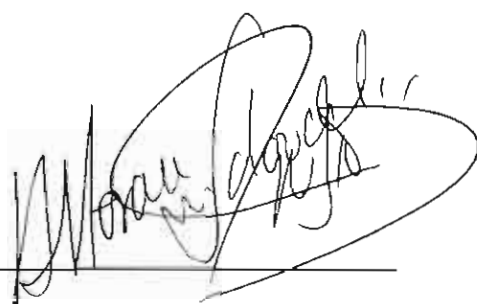
Aprobó la tesis que presentó

Arcelia Alvarado Islas

El día 30 de Octubre del año de 2006.

Jurado:

Cotutor: Dr. Ángel Horacio Sandoval Trujillo



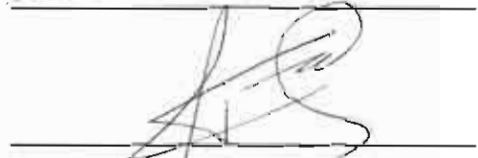
Cotutor: Dr. Álvaro Aguilar-Setién



Asesor: Dr. Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez



Sinodal: Dr. Jorge I. Torres Barranca



Sinodal: Dr. Ricardo Flores Castro



DEDICATORIA

A MI HIJO

JORGE MARTÍNEZ ALVARADO

AGRADECIMIENTOS:

AL DR. ROGELIO ALONSO MORALES

A LA DRA. MÓNICA SALMERÓN

AL M en C. EMILIANO TESORO

A LA QFB. YOLANDA LEÓN CAMPOS

A LA QFB. LETICIA RAMOS RAMÍREZ

A LA BIOL. MÓNICA SALAS ROJAS

A LA BIOL. NORMA SIERRA ROMERO

AL MVZ. GILBERTO CORTÉZ

AL MVZ. ARTURO GARCÍA FRAUSTRO

AL MVZ. OCTAVIO DE PAZ VILLAFÁN

AL M en C. PEDRO MEJÍA SÁNCHEZ

AL M en C. GERMÁN COLMENARES VILADOMAT

RESUMEN

La Fracción crotálica AL27 es una hemaglutinina o lectina que puede ser reconocida por receptores celulares e introducida a nivel citoplásmico, es probable que también posea cierta actividad mitotóxica reversible. Cualquiera que fuese su mecanismo de acción, en el presente trabajo, se empleó como un novedoso agente facilitador del mecanismo de transfección de un vector de expresión no viral, favoreciendo la introducción de segmentos de DNA en células musculares, utilizando como modelo un plásmido insertado con el gen que codifica para la glicoproteína G del virus de la rabia. En terapia génica, debido a que el DNA posee una baja eficiencia de transfección, generalmente se emplean vectores virales para facilitar la entrada del ácido nucleico. La propuesta es el empleo de un facilitador (Fracción AL27) de la transfección, a fin de minimizar los factores adversos, para ello, el objetivo fue evaluar a dicha fracción en su habilidad para incrementar los niveles de transfección del plásmido rábico en condiciones *in vitro*, *in vivo* en animales de laboratorio y finalmente en el perro, como principal especie trasmisora del virus de la rabia al humano. La fracción AL27 se aisló del veneno de serpiente *Agkistrodon piscivorus* por HPLC-RP y se corroboró que conservaba su capacidad de reconocimiento por receptores celulares hasta un título de 64 Unidades Hemaglutinantes (UH). El inmunógeno empleado fue el plásmido pC38, seleccionado de un panel de 18 clonas, construido por inserción del gen que codifica para la glicoproteína G de la cepa rábica HQIMSS99, en el vector de expresión pCL-neo. Los resultados *in vitro*, mostraron que pC38 en dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$, adicionado o no con 1.062 $\mu\text{g/ml}$ de AL27, transfectó células CHO bajo el sistema calcio-fosfato y por microscopia

confocal (MC) se observó mayor fluorescencia (+++) con la mezcla pC38/AL27, que con el plásmido pC38 solo (++) . La cuantificación por citometría de flujo (CF), presentó los porcentajes de expresión de 27.78% para pC38 y 38.66% para pC38/AL27. El experimento *in vivo*, consistió en formar tres grupos de ratones BALB/C: El grupo 1 se inoculó vía intramuscular en músculo tibial con pC38 en dosis de 40 µg/ml, el grupo 2 se inoculó en forma similar pero adicionado con 1.062 µg/ml de AL27, el grupo 3 fue control negativo. Se sacrificó la mitad de los animales de cada grupo a fin de obtener el tejido tibial, detectando por MC mayor expresión (+++) al empleo de pC38/AL27. Los ratones restantes se mantuvieron vivos por tres meses para la detección de anticuerpos por reducción de focos fluorescentes (RFFIT), obteniendo de 0.75 a 1.2 UI/ml (Unidades Internacionales por mililitro) para pC38 y de 1.1 a 1.27 UI/ml para pC38/AL27. Finalmente, se inocularon perros Beagle empleando las mismas dosis de pC38 y AL27, detectando anticuerpos en niveles hasta un máximo de 2.1 UI/ml para pC38/AL27 y de 0.17 UI/ml para pC38 (mínimo requerido es de 0.5 UI). Los resultados anteriores muestran que AL27 favoreció los mecanismos de entrada celular, con lo cual se generó un mayor nivel de expresión del gen que codifica para la glicoproteína G del virus rábico, brindando como consecuencia, un mayor estímulo del sistema inmune. Por lo tanto, es factible que la fracción AL27 pueda ser empleada como un agente facilitador de la transfección por vectores de expresión no virales, en procesos de terapia génica y/o vacunas génicas.

SUMMARY

The crotalid fraction AL27 is a haemoagglutinin or lectin that can be recognized by cellular receptors and introduced at the cytoplasmic level, it is also probable that has certain reversible myotoxic activity. No matter what its action mechanism, at the present work was used as a newly transfection agent for non viral expression vector, acting as an elicited agent for the DNA segment introduction to muscular cells, using as a model an inserted plasmid with the gene that codifies for the G glycoprotein of the rabies virus. At genetic therapy, because of the low transfection efficiency of the DNA, viral vectors usually are used to elicit the entrance of infectious agents. The proposal is to use an easy maker agent (AL27 Fraction) to non viral vector in order to minimize adverse factors, for this, the object was to evaluate such fraction in its ability to increase the levels of the rabic plasmid transfection within *in vitro* conditions, as well as *in vivo* with laboratory animals, and finally, in the dog, as the mainly transmission specie of the rabies virus to humans. The AL27 fraction was isolated from the venom of the snake *Agkistrodon piscivorus* by HPLC-RP and was assured it kept its recognition capacity by cellular receptors up to a titer of 64 Haemoagglutinate Unities (HU). The immunogenic used was plasmid pC38, selected from a panel of 18 clones, constructed by inserting the gene that codifies for the G glycoprotein of the rabies strain HQIMSS99, at the pCL-neo expression vector. The *in vitro* results, showed that pC38 at 1µg/ml doses, enriched with or without 1.062 1µg/ml of AL27, transfected CHO cells under the calcium-phosphate system and by confocal microscopy (CM) was observed major fluorescence (+++) with the mix pC38/AL27, than with pC28 itself (++) . The Flow Cytometry quantification (FC), exposed the expression

percentages 27.78% for pC38 and 38.66% for pC38/AL27. The *in vivo* experiment consisted of three groups using mice BALB/C: group 1 was inoculated through intramuscular route at the tibial muscle at 40 µg/ml doses, group 2 was inoculated in a similar way, but enriched with 1.062 1µg/ml of AL27 and group 3 was a negative control. Half of the animals were sacrificed from each group in order to obtain the tibial tissue, detecting by CM major expression (+++) when using pC38/AL27. The rest of the animals were maintain alive for three months to detect antibodies by reduced fluorescence focus (RFFIT), obtaining 0.75 to 1.2 IU/ml (International Units per milliliter) for pC38 and 1.1 to 1.27 IU/ml for pC38/AL27. Finally, Beagle dogs were inoculated using the same doses of pC38 and AL27, detecting antibodies at levels up to a maximum of 2.1 IU/ml for pC38/AL27 and 0.17 IU/ml for pC38 (minimum required is 0.5 IU). The former results show that AL27 elicited the cell entrance mechanisms, with which was generated a major level of the gene expression that codifies for the G glycoprotein of the rabies virus, bringing as consequence an enhanced stimulation of the immune response. Thereby, it is feasible that the AL27 fraction can be used as transfection agent for non viral vector expression, within genetic therapy procedures and genetic vaccines.

ÍNDICE GENERAL	
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	2
Vectores	2
Lectinas	4
Cardiotoxina	8
Bupivacaina	8
Rabia	9
Vacunas contra la Rabia en Medicina Humana	11
Vacunas contra la Rabia en Medicina Veterinaria	12
Vacunas de Nueva Generación	13
Potenciación de Vacunas de Nueva Generación	16
1.- Adyuvantes	17
2.- Sistemas Liberadores de Antígeno y de DNA	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
HIPÓTESIS	23
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS PARTICULARES	24
MATERIAL Y MÉTODOS	25
Cultivo de Tejidos	25
Cepas Virales	25
Plásmido Vacunal	26
Replicación y Purificación de Plásmido Vacunal (pC38)	26
Aislamiento de Fracción Crotálica	28

Transfección <i>in vitro</i>	30
Transfección <i>in vivo</i>	32
1.- Evaluación de Clonas Construidas	32
2.- Evaluación de pC38 con o sin la Fracción AL27	34
Evaluación de Vacuna Génica Rábica pC38 en Perros	35
RESULTADOS	37
Selección de Clona	37
Obtención de Fracción Crotálica	43
Fracción AL27 como Favorecedor de la Expresión del Plásmido Rábico	45
Evaluación de Vacuna Génica Rábica en Perros	52
DISCUSIÓN	54
LITERATURA CONSULTADA	66
Publicaciones Derivadas de Doctorado	78

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de respuesta al estímulo con una vacuna génica	15
Figura 2. Mecanismo de transporte del DNA exógeno por AL27	21
Figura 3. Mecanismo de entrada del DNA por daño celular con AL27	22
Figura 4. Selección de clonas de plásmido rábico por MC.	37
Figura 5. Selección de clonas de plásmido rábico por CF.	38
Figura 6. Selección de clonas por estimulación de la inmunidad en ratón	40
Figura 7. Comprobación de pureza de la clona pC38 por electroforesis	42

Figura 8. Aislamiento de la fracción AL27 del veneno de serpiente	43
<i>Agkistrodon piscivorus.</i>	
Figura 9. Actividad hemaglutinante de la fracción AL27	44
Figura 10. Incremento de expresión <i>in vitro</i> del plásmido pC38 por MC	46
Figura 11. Incremento de expresión <i>in vitro</i> del plásmido pC38 por CF	47
Figura 12. Incremento de expresión <i>in vivo</i> del plásmido pC38 por MC	49
Figura 13. Respuesta inmune inducida en ratón	51
Figura 14. Respuesta inmune inducida en perros	53

INTRODUCCIÓN

La terapia génica es una gran promesa para el tratamiento, cura y prevención de un amplio espectro de trastornos, por la introducción de genes terapéuticos en el tejido adecuado (1). Se define como el “proceso por el cual se inserta material genético en una célula, con el fin de hacer que esta produzca una proteína normal”, pero su alcance no sólo se limita a enfermedades genéticas, sino también a las de origen externo al organismo: virales, bacterianas, protozoarias, etc. Es una rama de la biotecnología, la cual surge con los avances en ingeniería genética, tras el conocimiento detallado de la estructura del DNA y de las enzimas que le cortan o ligan, generando genes recombinantes (híbridos o quimeras moleculares). Esta biotecnología, ha sido aplicada para la obtención de productos biológicos de uso terapéutico en grandes cantidades (insulina, hormona del crecimiento, interferón), así como para la obtención de vacunas génicas, anticuerpos monoclonales, sondas génicas, etc. (2).

Uno de los principales problemas que enfrentan la terapia génica y las vacunas génicas, es la necesidad de emplear sistemas de liberación del DNA que logren rebasar la pobre farmacocinética, la limitada distribución y la baja eficiencia de entrada del ácido nucleico (3). Dichos sistemas consisten en vectores que se encargan de transportar y colaborar en la expresión del material genético.

ANTECEDENTES

VECTORES

Los vectores son partes de DNA que se autorepican (generan copias de ellos mismos), con independencia del DNA de la célula huésped donde crecen. Estos, permiten tener múltiples copias de un fragmento específico de DNA, lo que les convierte en un recurso útil para producir cantidades suficientes de material. El proceso de transformación de un fragmento de DNA en un vector se denomina clonación. Una vez introducido en la célula el gen de interés, su nivel de expresión depende principalmente de los elementos reguladores de la transcripción y de la eficiencia de transducción del vector. Actualmente, se han desarrollado vectores de transferencia del tipo viral y no viral (4).

Los principales vectores virales son los retrovirus, adenovirus, virus adeno-asociados, herpes virus y lentivirus (5). En su construcción, el DNA o RNA del vector viral es cortado con enzimas de restricción, con el fin de eliminar las regiones patógenas e insertar el gen de interés médico. El vector, al realizar sus procesos de incorporación, transcripción y traducción de proteínas dentro de la célula, termina generando cantidades importantes de la proteína que tendrá efectos terapéuticos o preventivos en el individuo (2).

El empleo de los vectores virales puede ser eficiente, pero también puede acarrear algunos inconvenientes. Es sabido que algunos retrovirus generan una alta eficiencia de transfección en células que se dividen activamente. Sin embargo, no son aptos en tejido nervioso o muscular, ni aptos para su empleo *in vivo*, ya que son eliminados por el complemento del sistema inmune. Por su parte los adenovirus poseen una alta eficiencia de transfección en células que no se

dividen, pero, su efecto no es duradero y provocan respuesta inflamatoria e inmunológica (6), dirigida hacia el mismo vector (7).

Dentro de las opciones de vectores no virales, se cuenta con liposomas (3), plásmidos de DNA (5), citocinas (interleucinas IL-6, IL12) (8), electroporación (8, 9), inyecciones de DNA desnudo o bombardeo con partículas de oro (10). Los liposomas son esferas de lípido con centro acuoso que pueden ser o no unidos a agentes químicos llamados "policationes" como el polietilen-glycol (PEG). Son efectivos al ser captados por las células presentadoras de antígenos (APC), y por su habilidad de traspasar la membrana celular mediante receptores celulares. Su inconveniente es que requieren de la aplicación de varios estímulos y que su inmunogenicidad puede ser reducida por modificación del complejo lípido-PEG (3).

La electroporación en el sitio de inyección, es otro método de transfección para facilitar la entrada del gen de interés e incrementar la respuesta inmune de vacunas de DNA desnudo. Consiste en la inducción del músculo a secretar proteínas de fusión que son detectadas por las APC. El problema de éste método, consiste en que no todo el tejido tiene la misma resistencia hacia el voltaje aplicado, por lo que se llega a dañar al tejido y causar dolor, lo que provoca una reducción en la entrada de DNA externo y su posterior expresión (9).

Los plásmidos, consisten en cadenas circulares de DNA alterados para acarrear genes que codifican una o más proteínas antigénicas y están conformados por promotores de expresión (Citomegalovirus, SV40, etc.)(11). Son efectivos en su capacidad de replicación, pero generalmente requieren de la adición de algún otro sistema de liberación. Los complejos plásmido/policación han sido evaluados

frecuentemente, pero al ser comparados con los vectores virales, su eficiencia de transfección es pobre, debido a la baja actividad de transcripción por la rigidez de unión del complejo (12).

Harris JD y Lemoine NR (1996) (13), consideran que el mayor problema en los actuales sistemas, es la pobreza en la eficiencia de la liberación de los genes *in vivo*. Sugieren que éstos pueden ser subsanados con el desarrollo de nuevos vectores virales y/o el desarrollo de sistemas sintéticos que se combinen con los mejores elementos de la gama de vectores actuales. Concordando con la idea de estos autores, en el presente trabajo, se planteó el uso de un nuevo agente facilitador (fracción AL27) de los mecanismos de entrada del vector de expresión no viral, empleando como modelo una vacuna génica contra la rabia. La fracción crotálica AL27, es una "hemaglutinina" o "lectina" que se caracteriza por ser reconocida y transportada al interior de la célula mediante receptores celulares del tipo ácido siálico.

LECTINAS

Las lectinas son proteínas contenidas en el veneno de algunos crotálicos. Dicha proteína ha sido aislada del veneno de la serpiente *Agkistrodon piscivorus* (familia Viperidae, subfamilia Crotalinae). En estudios previos, se ha evaluado su grado de inocuidad celular y actividad hemaglutinante, mostrando un aparente reconocimiento de receptores celulares ácido siálico y penetración en el citoplasma celular (14,15).

Las lectinas, también denominadas "hemaglutininas", son potentes inductores de la aglutinación que se encuentran en una gran variedad de plantas, reptiles, animales, virus, microorganismos y el hombre, siendo la trombolectina, la primera

aislada del veneno de la serpiente *Bothrops atrox* (elápido) (16, 17). Posteriormente, esta fue detectada en veneno de otras serpientes de las familias Elapidae (insensible a agentes reductores), Crotalidae (sensible a agentes reductores) y Viperinae (con actividad aglutinante débil) (18) como *Agkistrodon contortix contortix*, *Agkistrodon piscivorus leucostoma*, *Crotalus atrox*, *Lachesis muta*, *Dendroaspis jamesoni*, *Agkistrodon rhodostoma*, entre otras (19). De acuerdo con su estructura, las lectinas animales han sido clasificadas en dos grandes grupos, las tipo C (calcio dependientes) que se localizan a nivel extracelular y se relacionan con receptores de la clase de las sialoglicoproteínas y las tipo S (thiol-dependientes) que se localizan a nivel extra e intra-celular y se unen fuertemente a carbohidratos de membrana como las glicoproteínas, glicolípidos y proteoglicanos (20).

Las lectinas tipo C presentes en células dendríticas, poseen una dualidad de acción, ya que pueden funcionar como receptores de adhesión celular señalizando a los patógenos o como mediadores de la unión e internalización de patógenos, como es el caso de los virus de inmunodeficiencia humana (HIV), citomegalovirus, ébola, dengue, hepatitis C, entre otros (21).

La lectina de *Agkistrodon piscivorus* al requerir de iones calcio en el mecanismo de aglutinación, fue categorizada dentro de las lectinas tipo C, con capacidad de reconocer estructuras de azúcar (β -galactosa) presentes en la superficie membranal de eritrocitos. Su estructura es homodimérica consistente en dos monómeros idénticos de peso molecular de 16200 kiloDaltones (kDa) unidos por puentes disulfuro, con dominios de reconocimiento de carbohidratos carboxi-terminales (CRDs) con 16 residuos conservados invariables (Gly-12, Cys-31, Gly-

69, Thr-82, Asp-83, Thr-87, Trp-92, Pro-97, Glu-104, Cys-106, Gly-114, Trp-118, Asn-119, Asp-120, Cys-123 y Cys-131) y la especificidad de unión a azúcares de los CRDs se relaciona con la secuencia de aminoácidos de la posición 96-98, la cual en las lectinas de los venenos corresponde al tripéptido Gln-Pro-Asp (22).

El papel de las lectinas en el envenenamiento ofídico aún no ha sido elucidado, pero se piensa que la aglutinación de eritrocitos causa un desorden en la coagulación sanguínea, aunque este efecto sólo ha sido observado en condiciones *in vitro* (22). Se considera que estas son proteínas no enzimáticas que selectivamente se unen a estructuras de carbohidratos, cuya función normal podría ser el decodificar la información encontrada (20). Para el efecto de aglutinación requieren de dos o más sitios de unión a azúcares para pasar a través de la membrana celular. Su bivalencia o polivalencia permite que interactúen con las mitades de azúcar en la superficie de células adyacentes, dando origen a la aglutinación de células y glóbulos rojos (23).

Debido a las propiedades biológicas y bioquímicas de las lectinas su uso se ha enfocado en la determinación de grupos sanguíneos humanos mediante pruebas de aglutinación (23). Se ha reportado que las lectinas de serpientes tienen actividad mitogénica, con una fuerte estimulación de linfocitos T y B, estimulando su transformación desde pequeñas células en reposo en grandes células en división mitótica (23, 24), además de la habilidad de estimular la agregación de plaquetas humanas (25) e inducir edema en el cojinete plantar en ratón (26). Por otra parte, se han realizado investigaciones en cuanto a su uso como inhibidor del desarrollo de células malignas, ya que estas aglutinan preferentemente a células

mamíferas que han sido transformadas por virus oncogénicos, carcinógenos químicos o células transformadas espontáneamente (23).

No existen antecedentes para el empleo de las lectinas (en este caso, AL27), como agentes facilitadores de la transfección por vectores de expresión no viral en vacunas génicas, pero se tiene conocimiento de que las tipo C aisladas de plantas (Concavalina A) (27), y las presentes en células dendríticas, poseen afinidad por antígenos virales (21). En el presente trabajo, se considera que si el plásmido acarreador de los genes que codifican para la glicoproteína G del virus de la rabia, es administrado simultáneamente con la lectina crotálica AL27, actuando ésta última como facilitador de la transfección, el plásmido podría ser transportado y penetrado al interior de la célula. La fracción AL27 no causaría daño alguno, pues en un estudio previo desarrollado en condiciones *in vitro* e *in vivo*, se demostró que no afecta la viabilidad celular, ni causa daño en tejidos musculares (15). Lo anterior es respaldado por otros autores, quienes trabajaron con lectinas de más de 30 venenos crotálicos, elápidos y viperinos. En su estudio, demostraron que las alteraciones iniciales causadas por este agente (pérdida de los procesos celulares, agregación celular, formación de sincitios, redondeo y desprendimiento celular) son reversibles y que las células recuperan su forma original y capacidad de proliferación a la resiembra (28).

Otro probable mecanismo de entrada de los plásmidos o fragmentos de DNA presentes en las vacunas génicas (en este caso el plásmido portador de los genes que codifican para la glicoproteína G del virus de la rabia), podría ser el que la proteína crotálica (AL27) actuara bajo cierta actividad mitotóxica reversible,

favoreciendo la entrada y expresión plasmídica mediante un efecto similar a el apreciado con las cardiotoxinas.

CARDIOTOXINA

La cardiotoxina es otro tipo de proteína aislada de veneno de serpiente (principalmente de la familia Elapidae), con actividad miotóxica reversible. Se caracteriza por causar degeneración muscular, específicamente en el área de inoculación, a diferencia de otras miotoxinas, quienes causan daño en forma sistémica. Consiste de polipéptidos básicos con efectos farmacológicos como hemólisis directa, contracción del músculo esquelético, cardiotoxico y citotóxico. Actúa a nivel de membrana celular por su unión mediante fuerzas electrostáticas no covalentes, penetrando su porción hidrofóbica en la matriz lipídica de la membrana, dando como consecuencia su ruptura, desaparición de la línea Z, dilatación del retículo endoplásmico, cambios en mitocondria y desorganización de las miofibrillas (29).

La inyección de DNA en músculo previamente tratado con cardiotoxina incrementa el número de células que expresan el antígeno e incrementa la respuesta inmune. El mecanismo en este caso no ha sido elucidado, pero se piensa que al igual que la bupivacaína (adyuvante químico), la expresión del DNA exógeno se media directamente en las células en regeneración o mediante la entrada y expresión del DNA por células inmunes reclutadas en el tejido dañado (30).

BUPIVACAÍNA

Recientemente, la bupivacaína ha sido empleada con el fin de mejorar la eficiencia de las vacunas génicas. Posee la capacidad de modular la respuesta al

estímulo vacunal favoreciendo la incorporación, expresión génica, presentación y procesamiento del antígeno en células transfectadas (31). La bupivacaína es comúnmente usada como un anestésico local que bloquea la transmisión de las neuronas y dirige la degeneración de las células musculares indirectamente. Este último efecto es aprovechado para facilitar la entrada y posterior expresión del DNA externo durante el proceso de regeneración celular. Su inconveniente recae en que no es adecuada para la vacunación a gran escala en el campo, ya que la bupivacaína debe ser administrada con cierta anticipación a la inoculación del DNA (31, 32).

La finalidad del presente trabajo fue evaluar a la fracción crotálica AL27 como probable agente facilitador de la transfección de un vector de expresión no viral, para su uso en terapia o vacunas génicas. Para ello, como modelo experimental, se seleccionó un plásmido rábico portador del gen que codifica para la glicoproteína G del virus de la rabia, ya que de ser efectivo el producto, de esta manera se podría contribuir al control de una enfermedad zoonótica de interés mundial.

RABIA

La rabia, causada por un virus de la familia *Rhabdoviridae* del género *Lyssavirus*, es una de las zoonosis más antiguamente documentada y temida por su letalidad cercana al 100% (33). A nivel mundial, continúa siendo un problema de salud pública y de acuerdo con la World Health Organization (WHO), es la responsable de 55,000 muertes humanas anuales, ocurriendo la mayoría en países subdesarrollados como Asia y África, siendo el perro el principal trasmisor (34). En países desarrollados de Europa y en Estados Unidos, las muertes humanas

han disminuido por el estricto seguimiento de las campañas de vacunación profiláctica del perro doméstico y por el control humanitario de las poblaciones, convirtiendo así a los animales silvestres en la principal fuente de transmisión. Los porcentajes de ocurrencia en Estados Unidos involucran al mapache en el 50.5% de los casos y al zorrillo en un 24% (35). En su último boletín informativo, la Organización Panamericana de la Salud (OPS) notificó 60 casos de rabia humana en los países de las Américas en el 2001, ocurriendo la mayoría de ellos en Brasil, Ecuador, Haití, Bolivia y el Salvador. En dicho estudio, la ocurrencia de rabia humana reportada para México fue de siete casos. En dos, la especie transmisora fue el perro y en los 5 restantes fueron animales silvestres: dos zorrillos, un puma, un murciélago hematófago y uno no hematófago. La OPS también notifica 12,540 casos de rabia animal, de estos 7,779 ocurrieron en América del Norte (Canadá, Estados Unidos), 46 en el Caribe, y 4,715 en América Latina (América Central, Área Andina, Brasil, Caribe Latino, Cono Sur y México). En los correspondientes a México, se reportaron 290 casos de rabia en diferentes especies, de los cuales 103 fueron en animales de compañía (perro, gato), 163 animales domésticos (bovino, caprino, equino, etc.) y 24 animales silvestres (murciélago, zorrillo, zorro, etc.) (36).

A más de un centenario de haberse iniciado la prevención de la rabia mediante la inmunización (1885), aún no logra erradicarse. Se ha estimado que cada año se vacuna por lo menos 50 millones de perros, con una cobertura de sólo un 30 a 50% de la población canina, la cual es demasiado baja para romper el ciclo de transmisión (37).

VACUNAS CONTRA LA RABIA EN MEDICINA HUMANA

Para el control de la rabia humana se han desarrollado una gran cantidad de vacunas. Las primeras, denominadas Fermi, Semple y Fuenzalida, son preparadas en tejido nervioso de cabra, oveja, conejo o ratón e inactivadas con fenol o luz ultravioleta, no son muy inmunogénicas, requieren de la aplicación de numerosas inyecciones, no son seguras y causan reacción anafiláctica por contaminación con proteínas del tejido nervioso en las que son producidas. No obstante, aún son elaboradas y empleadas en muchos países subdesarrollados en donde la rabia es endémica, como en el sur y sureste de Asia (35, 38). En la mayoría de los países, estas vacunas han sido reemplazadas por las elaboradas en cultivos celulares, como las de fibroblastos humanos (HDVC), fetales de mono Rhesus (RVA), riñón de hámster Syrio (PHKCV), Vero (PVRV) y las de embrión de pollo (PCECV), todas ellas inactivadas con β -propiolactona o formalina y son seguras, bien toleradas e inmunogénicas cuando son administradas profilácticamente o terapéuticamente (35). Su principal desventaja es que en la terapia post-exposición se requieren múltiples dosis para asegurar la protección, dando como consecuencia un alto costo. Se reporta que las HDVC y PCECV son prohibitivas para los que viven en países subdesarrollados, dando como ejemplo, que un ciudadano de la India debe trabajar 144 días para pagar el costo de un tratamiento post-exposición (39). Además, las enfermedades inmunosupresoras, el uso de agentes inmunosupresores y tratamientos anti-malaria, pueden llegar a interferir en el desarrollo de la inmunidad cuando se aplica este tipo de vacunas (40).

VACUNAS CONTRA LA RABIA EN MEDICINA VETERINARIA

A la fecha, se cuenta con varias vacunas comerciales para animales de compañía y domésticos elaboradas con virus rábico inactivado. Se consideran seguras pues contienen al antígeno prácticamente muerto. Su desventaja es que inducen una respuesta protectora débil y es necesario el empleo de adyuvantes, ya que no pueden entrar eficientemente a la vía del complejo mayor de histocompatibilidad clase I (MHC-I) (30), y cabe la posibilidad de una inactivación incompleta, con la subsecuente difusión inadvertida de partículas patogénicas residuales (41). Además, algunas de ellas han sido asociadas con la formación de fibrosarcomas en el sitio de inyección, en gatos (42).

Las vacunas vivas son elegidas preferentemente por contener el agente viral atenuado, es decir, poseen una patogenicidad reducida. Lo anterior les da la ventaja de generar una inmunogenicidad sostenida. Sin embargo, no son completamente seguras, pues con ellas se corre el riesgo de reversión a la virulencia, no pueden ser empleadas por individuos inmunocomprometidos y se corre el riesgo de contaminación por otros agentes durante el proceso de producción (30). Dentro de las vacunas convencionales elaboradas con virus vivo modificado-atenuado para la vacunación oral de animales silvestres en Europa, se cuenta con la llamada SAD_{Berne} y una variante de ésta de baja patogenicidad denominada SAG-2. La tipo Berne resulta ser muy efectiva en el zorro y el chacal (43, 44), pero no inmuniza o induce bajos niveles de seroconversión en el zorrillo (45), se requieren dosis altas para inducir inmunidad en perros (46) y es patogénica en el papión (mono africano) (47), mientras que SAG-2, al tener

cambios en el codón 333 de la glicoproteína, se convirtió en una cepa apatógena que ha garantizado seguridad y eficacia en perros y animales silvestres (zorro, tejón, hurón, visón, rata de campo y otros) (48).

Las vacunas recombinantes, en las que el fragmento inmunogénico del antígeno es insertado en un vector de expresión, resultan ser efectivas al favorecer su síntesis endógena, permitiendo la asociación con el MHC-I e inducción de linfocitos T citotóxicos (CTLs) $CD8^+$, el acceso al MHC-II e inducción de células T cooperadoras (Th) $CD4^+$ (30) e incremento de anticuerpos virus neutralizantes tras su inoculación oral, con protección al desafío en la fauna silvestre. Sin embargo, se requieren dosis muy altas para inducir una inmunidad protectora en perros, lo que las hace imprácticas, por razones económicas (46, 49).

VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN

Una posible solución para los problemas asociados con la rabia de los animales domésticos o silvestres, podría ser la vacuna de DNA, también conocida como “vacuna génica” o proceso de “inmunización con DNA”. Consiste en la inyección directa de un vector (plásmido), el cual dirige la expresión del gen que codifica para la glicoproteína G. El plásmido se introduce en el compartimiento nuclear de la célula huésped para ser transcrito en RNA mensajero, mismo que es traducido en proteína en los ribosomas libres, finalizando el proceso de síntesis y ocurriendo la glicosilación de la proteína G en el retículo endoplásmico y el aparato de Golgi. Una vez replicada la proteína vacunal, esta puede ser excretada y presentada al MHC-II para estimular la producción de anticuerpos ($CD4^+$) o ser fraccionada en péptidos que estimularán la respuesta inmune celular con producción de $CD8^+$ (MHC-I), induciendo así un amplio rango de protección (50)

(Figura 1). Su ventaja radica en tener pocos efectos adversos, estimular la respuesta inmune humoral y celular con inducción de una fuerte respuesta de células T cooperadoras (Th1) y linfocitos T citotóxicos (CTL), activar a las células presentadoras de antígenos (APCs) para la síntesis de proteínas endógenas, comprometiendo al MHC de clase I y II, brindando expresión antigénica prolongada, actividad efectora de larga vida, gran termoestabilidad y es fácil de producir (51).

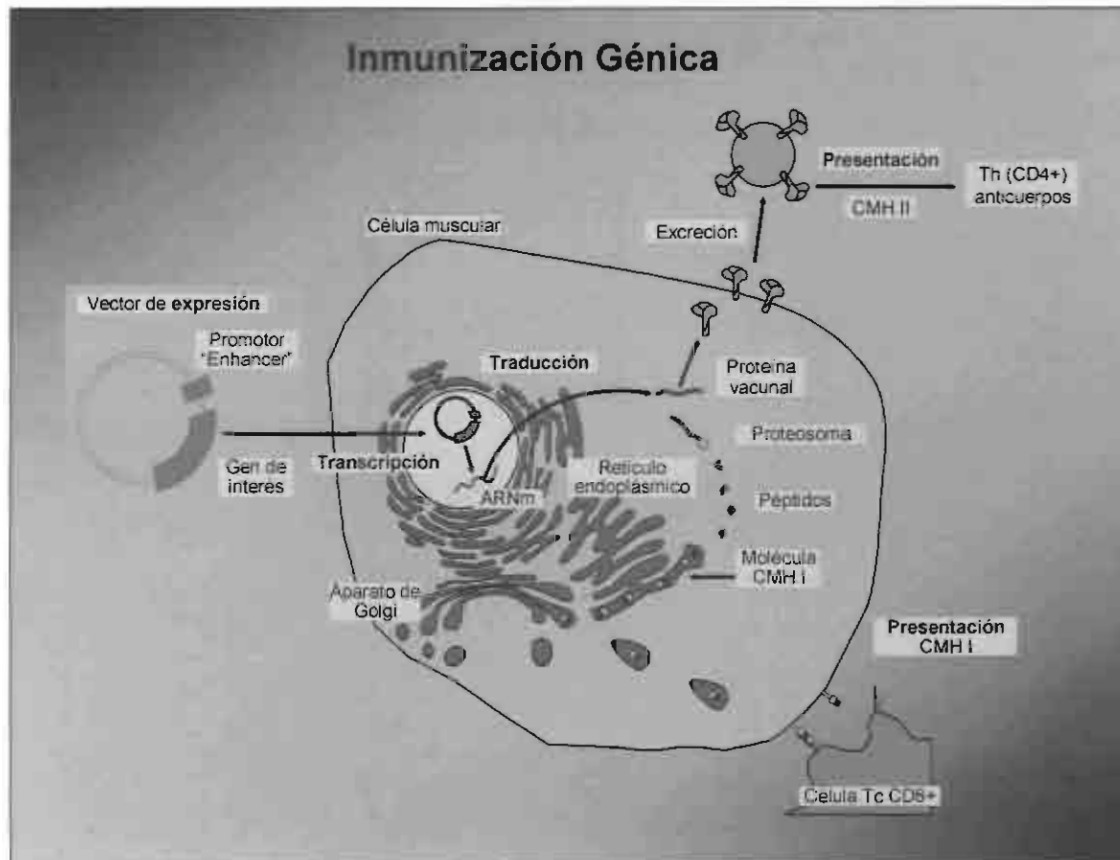


Figura 1.- Mecanismo de respuesta al estímulo con una vacuna génica. El gen de interés, insertado en un plásmido (vector de expresión no viral), al ser introducido en el compartimento nuclear es transcrito en RNAm. Este es traducido en proteína en los ribosomas. El proceso de glicosilación de la proteína ocurre en el retículo endoplásmico y aparato de Golgi. La proteína vacunal puede ser excretada y presentada al MHC-II, estimulando la producción de CD4⁺, y/o fraccionada en péptidos que se presentarán al MHC-II y estimularán la respuesta inmune celular, con producción de CD8⁺.

Dentro de las vacunas de DNA dirigidas contra la rabia, se han evaluado las construidas con dos diferentes proteínas: la glicoproteína G y la proteína N. La glicoproteína G, es la principal contribuidora en la patogenicidad viral y en la formación de anticuerpos neutralizantes y normalmente se encuentra formando trímeros a nivel de membrana (52). Tras su inserción en diferentes tipos de promotores, principalmente el citomegalovirus humano (HCMV), se han obtenido en la mayoría de los casos, resultados satisfactorios en ratón y primates, además de algunos estudios en perros, mostrando protección pre y post-exposición al desafío (53, 54). Mientras que con la proteína N, que normalmente se encuentra estrechamente unida al RNA formando el complejo de ribonucleoproteína (RNP) (52), sólo se han logrado inducir bajos niveles de anticuerpos, los cuales no confieren protección al desafío (55).

POTENCIACIÓN DE VACUNAS DE NUEVA GENERACIÓN

Uno de los inconvenientes en las vacunas génicas, es que sufren de reducida inmunogenicidad, debida a la insuficiente entrada celular del DNA desnudo en presencia de sales (56), o a la baja eficiencia de transfección por carencia de señales de reconocimiento de importancia, por lo que se ha requerido de la adición de agentes que incrementen el nivel de expresión del gen de interés, mediante vectores virales o no virales, genéricamente conocidos como "sistemas para liberación de antígenos y DNA, y/o agentes que estimulen la respuesta inmune, como los adyuvantes.

Los adyuvantes, son sustancias o combinación de sustancias que actúan de un modo no específico para incrementar la inmunogenicidad de un antígeno. Los sistemas para liberación de antígenos, son formulaciones farmacéuticas que

elevan o facilitan la acción del antígeno por su liberación en la cantidad y sitio de acción correcto, con el fin de maximizar la respuesta inmune y minimizar los efectos indeseados (57).

1.- Adyuvantes

Los adyuvantes tradicionales son los más empleados en las vacunas de nueva generación y consisten básicamente en diferentes tipos de emulsiones de agua en aceite, aceite en agua, aluminio, saponinas, etc, como los comercialmente denominados ISA51, ISA720, MF59, SBAS2, SBAS4, ó el adyuvante completo de Freud (58), quienes funcionan como depósitos que liberan al DNA en forma prolongada, generando estímulos en el sistema inmune a través de las células Th1 y Th2, con excepción del adyuvante completo de Freud quien estimula a las Th2 y suprime vigorosamente a las Th1(31).

Entre los inmunógenos modernos más estudiados se cuenta con las toxinas bacterianas que actúan a nivel de mucosas, ejemplo de ellas son la toxina colérica (CT) y la termolábil de *E coli* (LT), quienes estimulan eficientemente la respuesta de Th1 y Th2. Sin embargo, en algunos casos, la respuesta humoral es antígeno dependiente y llegan a ser tóxicas para el sistema nervioso central (59).

2.- Sistemas liberadores de antígenos y de DNA

Consisten en vectores de expresión viral o no viral que actúan favoreciendo la entrada y replicación del gen de interés. Entre los no virales se cuenta con los agentes moleculares, consistentes en construidos de genes de citocinas, quienes actúan eficientemente al generar y mantener a las células T de memoria, como las interleucinas IL2, IL-12, IL-15. Sin embargo, diversos autores recomiendan que las citocinas a su vez sean adicionados con adyuvantes tradicionales, a fin de

mejorar la inmunidad (60, 61); entre los vectores de expresión viral están algunas proteínas estructurales de partículas virales (VLPs) como las HPV (papiloma humano), de Rotavirus y de SHIV (virus de inmunodeficiencia simio-humano), quienes estimulan fuertemente a las células Th y CTL (62). Por otra parte, en el campo de los vectores de expresión se ha experimentado con la adición de partículas poliméricas como el ISCOM (compuesto por nano partículas de saponinas, colesterol y fosfolípidos), quienes estimulan eficientemente la respuesta humoral y celular tras la presentación del antígeno al MHC clase I y II (57), y las micro-esferas de poliéster con ácido L o D-láctico ó glicólico (PLGA), quienes activan la respuesta vía macrófagos, células dendríticas (DCs) y CTL. Su inconveniente es que el fragmento génico puede perder solubilidad y antigenicidad en el proceso de encapsulación (63).

En el presente trabajo, la finalidad fue evaluar un novedoso agente facilitador del mecanismo de transfección de un vector de expresión no viral, la fracción crotálica AL27, quien podría actuar como un agente acarreador del gen de interés al citoplasma celular, y/o generar un proceso de daño celular reversible, tras lo cual se facilitaría la entrada y posterior replicación del DNA.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La terapia y vacunas génicas representan una gran promesa para el control de los desordenes genéticos, así como para la prevención de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, se ha reconocido abiertamente que con la administración de DNA desnudo, la capacidad de expresión del gen externo es muy limitada y, en el caso de las vacunas génicas, sólo se induce una débil respuesta inmune. Lo anterior es debido a que la penetración de genes exógenos dentro de la célula huésped, no es sencilla. La solución hasta este momento ha sido el uso de vectores de expresión. La mayoría de ellos son de origen viral, ya que se aprovecha la capacidad de entrada y replicación intracelular de éstos microorganismos para favorecer la expresión del fragmento de DNA de interés, pero esta misma virtud, les convierte en agentes inseguros, pues algunos, pueden causar reacciones inmunológicas severas (64) y/o poseer una alta actividad tóxica (vectores retrovirales)(13). El segundo tipo de vector de expresión está constituido por los agentes no virales, como los liposomas, citocinas, DNA desnudo, bombardeo con partículas de oro, electroporación, plásmidos de DNA, etc. La mayoría efectivos, pero con algunas desventajas como la baja eficiencia de transfección, daño celular, necesidad de emplearse algún otro adyuvante o sistema de liberación de DNA, etc., por lo cual se consideró necesario evaluar un nuevo agente, que pudiese actuar como un facilitador de la transfección de vectores, y que no causara trastornos celulares, tóxicos, ni inmunológicos.

En estudios previos se ha comprobado (14, 15) que la fracción crotálica AL27 es inocua en condiciones *in vitro* e *in vivo*, además de ser reconocida por receptores celulares ácido siálico e internalizada a nivel de citoplasma (23). Esta virtud podría

ser aprovechada para emplearse como un facilitador del mecanismo de transfección de un vector de expresión no viral, que acarrearía los genes de interés que se requiera reemplazar o replicar en una terapia o a la aplicación de una vacuna génica (Figura 2), y/o aprovechar su probable efecto de ruptura y posterior regeneración de la célula, proceso que facilitaría el acceso y expresión del plásmido, con la subsecuente estimulación de la inmunidad humoral y celular (Figura 3). Como modelo experimental, en el presente trabajo, para evaluar a la fracción crotálica AL27 como probable agente facilitador de la transfección de un vector de expresión no viral, se planteó su adición a una vacuna génica contra la rabia. Dicha vacuna consta de un plásmido, construido por la inserción del gen que codifica para la glicoproteína G del virus de la rabia, en el vector de expresión pCL-neo. Este tipo de vacuna ha sido evaluada en estudios previos realizados en el Instituto Pasteur de Paris, con un plásmido similar (pGPV), detectando su inmunogenicidad en ratón, primate y perro, con resultados alentadores.

Al obtener resultados efectivos con este nuevo agente facilitador de vectores de expresión no viral (Fracción AL27), también se podría contribuir al control de la rabia canina mediante una vacuna génica nacional, ya que el plásmido propuesto fue construido con una cepa canina aislada en México, por genetistas de nuestro país. Lo anterior contribuiría en la generación de un biológico seguro, portador de sólo un fragmento del gen de virus rábico, evadiendo así los riesgos que conlleva el uso de agentes virales vivos que pueden revertir a la virulencia y/o administrar virus ineficientemente atenuados.

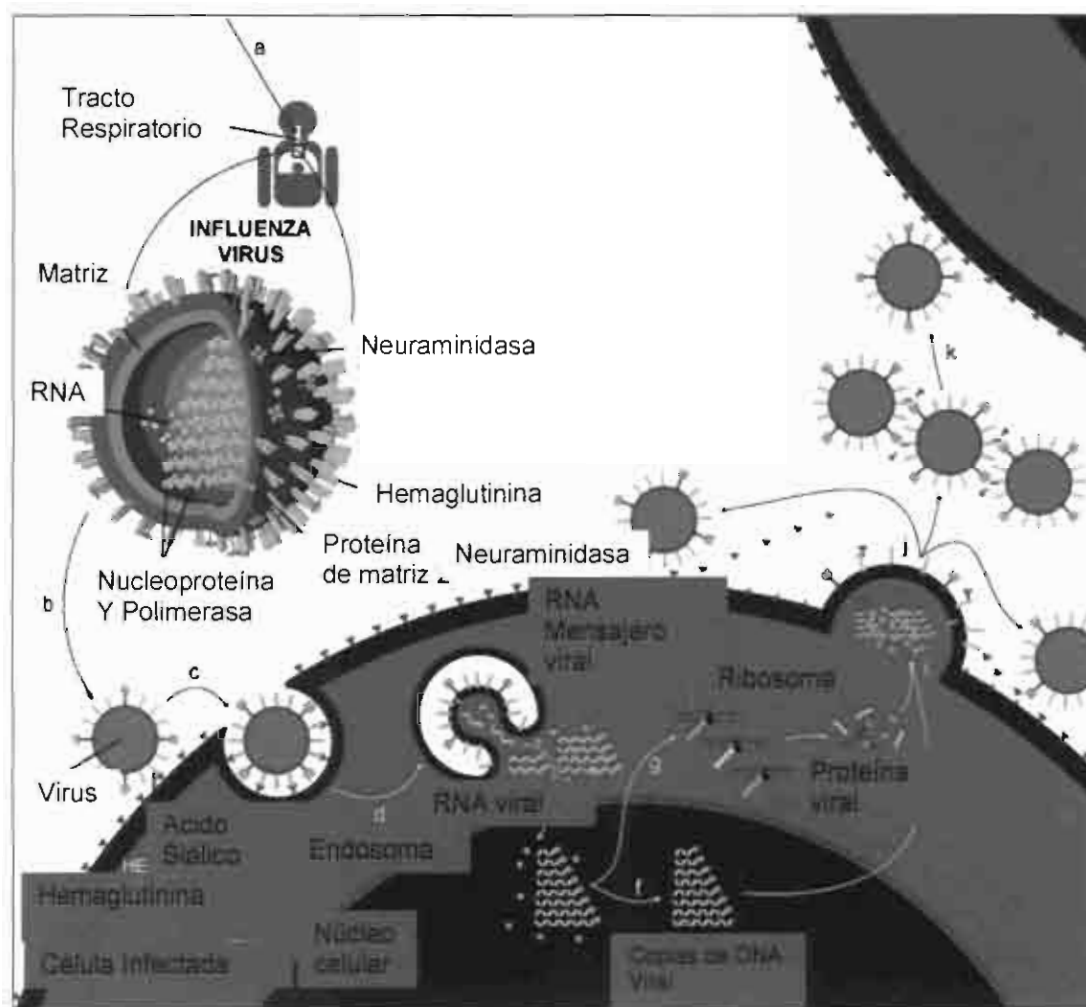


Figura 2.- Mecanismo de transporte del DNA exógeno por AL27 (basándose en el modelo de infección del virus de Influenza). La fracción AL27 es una lectina o hemaglutinina que por tener una actividad similar a la ejercida por las hemaglutininas virales, podría ser reconocida por receptores celulares ácido siálico y actuar como un agente acarreador, internalizando al plásmido rábico pC38 en la célula huésped, generando posteriormente una mayor expresión plasmídica.

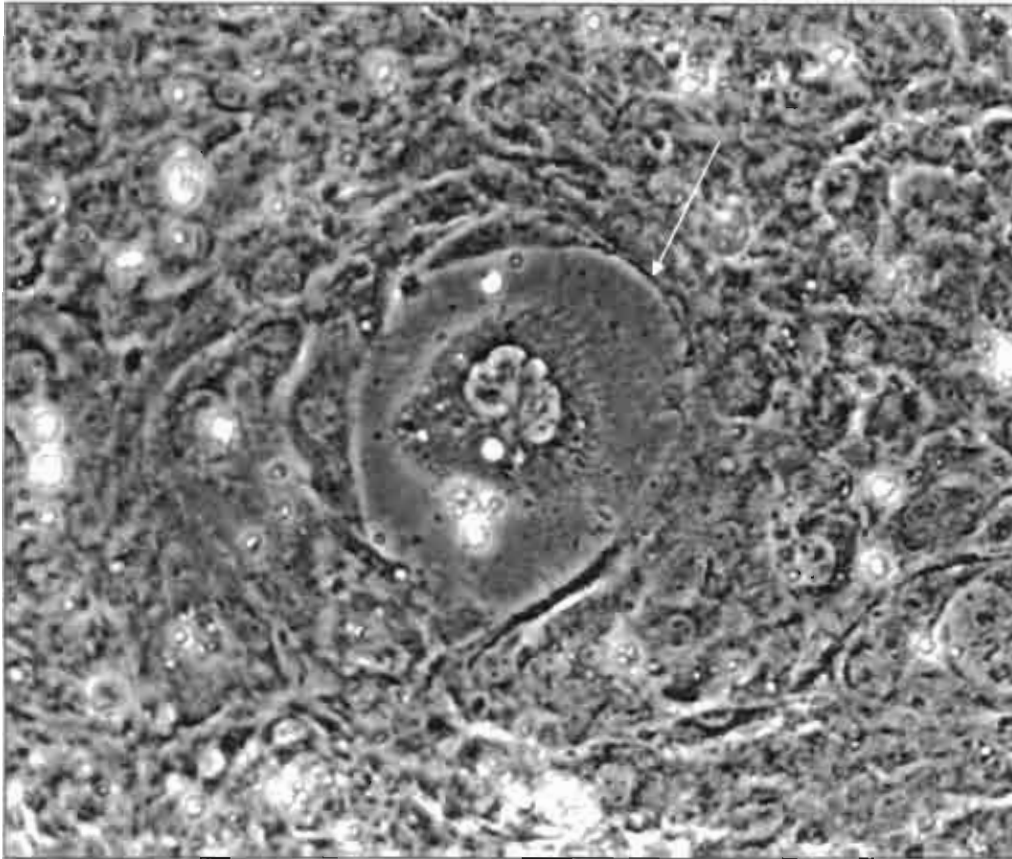


Figura 3.- Mecanismo de entrada del DNA por daño celular con AL27. La fracción crotálica AL27 podría actuar en forma similar a las cardiotoxinas, provocando una degeneración inicial de las células musculares, como la observada en la célula PK-15 marcada por la flecha, en la que se aprecia la introducción del marcador de tinta china, seguida del proceso de regeneración. En esta etapa, el fragmento de DNA, al igual que la tinta china, podría ser introducido al interior de la célula, con su subsecuente expresión antigénica.

HIPÓTESIS

La fracción crotálica AL27 actuará como un agente facilitador de la transfección por un vector de expresión no viral, favoreciendo los mecanismos de entrada del plásmido acarreador de la glicoproteína G del virus de la rabia, para su posterior replicación en la célula huésped.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la eficiencia de la fracción crotálica AL27 para actuar como un agente favorecedor de la transfección de un vector de expresión no viral, susceptible de emplearse en terapia y vacunas génicas.

OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Evaluar el incremento de la expresión del plásmido rábico, tras la transfección favorecida por la adición de la fracción crotálica AL27, en condiciones *in vitro*.
- 2.- Evaluar el incremento en la expresión y estimulación de la respuesta inmune del plásmido rábico, tras el favorecimiento de la transfección por adición de la fracción crotálica AL27, en condiciones *in vivo*, en animales de laboratorio (ratón).
- 3.- Evaluar el incremento en la estimulación de la respuesta inmune, en perros vacunados con el plásmido rábico pC38 adicionado con la fracción crotálica AL27.

MATERIAL Y METODOS

CULTIVO DE TEJIDOS

Se emplearon las líneas celulares CHO (células de ovario de hamster) (Cat. LC-18, In vitro) y BHK-21 (células de riñón de hamster sirio) (Cat. LC-10, In vitro). La siembra de ambas fue a una concentración de 2×10^5 células/ml. Las primeras se replicaron en botellas de poliestireno estériles con superficie de 9 cm^2 (Cat. 170920, Nunc), empleando medio de cultivo F12 HAM (Cat. ME-032, In vitro) enriquecido con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Cat. F2442, Sigma) y adicionado con una mezcla de penicilina-estreptomicina en proporción de 10000 UI/ $\mu\text{g/ml}$ (Cat. A-01, In vitro), con incubación a 37°C hasta obtener un 80% de confluencia celular. Las segundas se replicaron en botella de poliestireno de 175 cm^2 (Cat. 184502, Nunc) y/o microplacas de fondo plano de 96 pozos (Cat. 163320, Nunc), con medio MEM Glasgow (Cat. ME055, In vitro) suplementado con SFB y mezcla de penicilina/estreptomicina en concentración similar a la descrita previamente, además de 0.8 g/L de bicarbonato de sodio. La incubación fue por 24-48 h a 37°C , hasta obtener monoestratos 100% confluentes (65).

CEPAS VIRALES

Se emplearon 2 cepas de virus rábico. La primera fue la cepa de referencia PV (virus Pasteur) con título de $10^{-5} \text{TCID}_{50\%}$ (Dosis Infectantes en Cultivo de Tejidos_{50%}) y la segunda fue una cepa nacional, aislada en el seguimiento de un caso de rabia humana producida por un quiróptero hematófago, denominada HQIMSS99, con título de $10^{-3} \text{TCID}_{50\%}$. Ambas fueron replicadas por inoculación de monoestratos BHK con 0.5 ml de suspensión viral e incubación a 37°C por 1 h. El virus fue decantado y los monoestratos se suplementaron con medio MEM

Glasgow e incubaron por 48 h a 37°C. La liberación viral se dio mediante tres ciclos de congelación-descongelación (-70°C y medio ambiente) y la suspensión viral se clarificó por centrifugación a 3500 xG por 10' (Centrífuga Beckman TJ-6) y concentrada en centrífuga refrigerada a 12000 xG por 1 h (MSE, High Speed 18) (65, 66).

PLÁSMIDO VACUNAL

Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa-transcriptasa reversa (PCR-RT) se clonó el gen que codifica para la proteína G del virus de la rabia HQIMSS99. Este fue insertado en el sitio de restricción Xba1 del vector de expresión comercial pCL-neo (Cat. E1841, Promega). El construido resultante se replicó en células competentes *E. coli* (DH 10b). La suspensión fue sometida a incubación en hielo por 30', seguida de 2' a 42 °C y 1' más en hielo, finalizando con su siembra por 24 h a 37°C en medio sólido de Luria Bertani (LB) adicionado con 50 µg/ml de kanamicina. Se Aislaron y evaluaron 18 diferentes clonas (números 8, 11, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 29, 34, 38, 39 y 52). De estas, se seleccionó la clona 38 (plásmido vacunal pC38) por mostrar una mayor capacidad de expresión en transfecciones *in vitro* realizadas en células CHO bajo el proceso calcio-fosfato.

REPLICACION Y PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDO VACUNAL (pC38)

El plásmido seleccionado (pC38) fue replicado en células *E. coli* DH 10b. Se sembró inicialmente en 5 ml de caldo LB (Cat. L3022, Sigma) con incubación por 8 h a 37°C en agitación constante a 300 rpm. Se resembró en 5 Lts. de LB con incubación por 12-16 h a la misma temperatura y nivel de agitación. El paquete bacteriano se obtuvo por centrifugación a 6000 xG a 4°C por 15' (67, 68).

El plásmido libre de contaminantes, se obtuvo por su paso a través de una columna de intercambio aniónico, utilizando un Kit comercial (Cat. 12143, Quiagen) (68, 69, 70). Para ello, el paquete bacteriano se disolvió por pipeteo en 100 ml de amortiguador de resuspensión (Tris-Cl 50mM, EDTA 10 mM, pH 8.0) y 100 μ g/ml de RNasa (Cat. 19101, Quiagen). Se adicionaron 100 ml de amortiguador de lisis (NaOH 200 mM, 1% SDS) mezclando suavemente por 5' a temperatura ambiente y se agregaron 100 ml de amortiguador de neutralización (Acetato de potasio 3.0 M) para ser incubado en hielo por 20'. Se centrifugó por 2 ocasiones a 20000 xG por 45' a 4°C, se colectó el sobrenadante y tomó una muestra para análisis. El sobrenadante se cargó en una columna de resina de intercambio aniónico previamente equilibrada (amortiguador de equilibrio: NaCl 750 mM, MOPS 50 mM, 15% isopropanol, 0.15% tritón, pH 7.0) y tomó una segunda muestra. En la columna, el DNA fue clarificado por dos ocasiones con 30 ml de amortiguador de lavado (NaCl 1.0M, MOPS 50 mM, 15% isopropanol, 0.15% triton, pH 7.0), tomando una tercera muestra. Finalmente, en la columna se vertieron 30 ml de amortiguador de elusión (NaCl 1.25g, Tris-Cl 50mM, 15% isopropanol, pH 8.5) y se tomó la cuarta muestra para evaluación del proceso de purificación. El DNA se precipitó con isopropanol y centrifugó a 15000 xG por 30' a 4°C, para ser lavado posteriormente con etanol al 70% y centrifugado a 5000 xG por 10'. El DNA obtenido se dejó secar a 55°C por 5', se resuspendió en 10 μ l de agua estéril y almacenó en congelación a -70°C.

Las muestras colectadas durante el proceso fueron analizadas mediante electroforesis (71). Para ello se preparó un gel de agarosa al 1% (Cat. V3121, Promega) en amortiguador TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1mM, pH 8.0)

calentándose a punto de ebullición. Tras el enfriamiento del gel a 60°C, se adicionó 1.5 µl de bromuro de etidio (10 µg/µl). Se depositaron 5 µl/pozo de c/u de las muestras a las que previamente se adicionó 1/5 de volumen de amortiguador de carga (0.25% xilencianol, 0.25% azul de bromofenol, 30% glicerol). El marcador de tamaño molecular fue desde los 8454 hasta 702 pares de bases (pb) (Cat. 11209264001, Roche). El corrimiento fue con amortiguador TBE a 30 mA, a 80 volts, por un tiempo de aproximado de 60'.

La concentración de DNA se determinó con ayuda de un espectofotómetro a una longitud de onda de 260 nm. Para ello, 2 µl de c/u de las muestras se mezcló con 2 ml de solución de Hoechst (Cat. H33258, Hoechst), (0.1 µg/µl de Hoechst en amortiguador 1X de TNE [Na Cl 0.2 M, Tris-Cl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 7.0]). Como control se empleo un DNA estándar en concentración de 100 µg/ml.

AISLAMIENTO DE FRACCIÓN CROTÁLIDA

La fracción crotálica AL27 se obtuvo a partir de veneno liofilizado de la serpiente *Agkistrodon piscivorus*, donado amablemente por la Dra. Mónica Salmerón del Herpetario de la Facultad de Ciencias de la UNAM. Para el aislamiento de la fracción, se recurrió al proceso de cromatografía líquida de alta presión, en fase reversa (HPLC-RP) (72, 73) adaptando al equipo una columna de gel de sílice C₁₈ (5µ 4.6 X 2.50 mm, marca Beckman) y un inyector de 50 µl (Cat. 218TP, Vidac). El veneno se diluyó a una proporción de 10 mg/ml de H₂O grado HPLC (Cat. 27,073-3, Sigma) y se filtró con membrana Millipore de nylon de 0.22 µm de porosidad (Cat. GSWP 047 00, Millipore). La solubilización y separación de los polipéptidos fue con ácido trifluoroacético (TFA) (Cat. 09653, Sigma) al 0.1% en H₂O grado HPLC (solvente A) y como modificador orgánico se empleó acetonitrilo

(ACN) (Cat. 27071-7, Sigma) al 0.1% en TFA (solvente B); ambos fueron desgasificados por vacío y agitación, con filtro Millipore tipo GV de 0.22 μm . El gradiente de elución fue a una proporción inicial de 30% del solvente B sobre el solvente A, a un tiempo de 10', con un rango de flujo de 1ml/min. La absorbancia fue medida a una longitud de onda de 280 nm.

Se colectó la proteína correspondiente al pico 12 con tiempo de elución de 6.4', manifestados en el análisis cromatográfico de acuerdo a referencia previa (15). Para concentrar la proteína se liofilizó (74) y resuspendió para su uso en solución salina (0.85 g NaCl en 100 ml H₂O, pH 7.2). La conservación de la actividad aglutinante de la fracción se determinó mediante la prueba de Hemaglutinación (HA) (39, 40). Como control se empleó veneno de *A piscivorus* reconstituido en proporción de 6.25 mg/ml, con solución reguladora de Tyrodes (1g glucosa, 8g NaCl, 0.5 g NaH₂PO₄·H₂O, 1 g NaHCO₃, 0.2 g CaCl₂, 0.1 g MgCl₂, 0.1g KCl, en 1L H₂O, pH 7.4). Se emplearon glóbulos rojos de conejo al 2.5%, colectados en tubos "vacutainer" con EDTA o heparina como anticoagulante y lavados por tres ocasiones por centrifugación a 6000 xG con solución salina. Se realizaron diluciones dobles desde 1:2 hasta 1:256 de la fracción AL27 y/o veneno crotálico con solución salina (50 μl c/u) y adicionó una cantidad similar de glóbulos rojos de conejo. La incubación fue por 20' a temperatura ambiente y la lectura fue por apreciación de la aglutinación. Las unidades de hemaglutinación (UH) en la prueba, se definieron como el recíproco a la dilución final en que se manifestó la hemaglutinación (17).

TRANSFECCIÓN *IN VITRO*

Para evaluar la capacidad de expresión de las clonas construidas, así como de la seleccionada y replicada (pC38) se realizaron transfecciones *in vitro*, bajo el método calcio-fosfato (75, 76).

Cada plásmido se empleó en dosis de 5 μ l/botella a una concentración de 1 μ g/ μ l, adicionados con 6 μ l de CaCl₂ 2.4 M (Cat. C2052, Sigma) y complementados a un total de 60 μ l con agua grado biología molecular estéril (Cat. W4502, Sigma), mezclando la solución por pipeteo suave. En forma independiente, un volumen igual de amortiguador 2X HEPES (Cat. H1012, Sigma) se burbujeó por pipeteo y adicionó gota a gota a la mezcla anterior, se agitó brevemente con ayuda de un vortex por 2 a 4" e incubó por 20' a temperatura ambiente. Las inoculaciones con pC38 fueron por duplicado. En una de las botellas se siguió el procedimiento normal de transfección, mientras que en la segunda se adicionó la fracción AL27 en dosis de 1.062 μ g/ml en el último paso.

Los cultivos de células CHO desarrollados a un 80% de confluencia se prepararon realizando un cambio de medio de cultivo suplementado con 10% de SFB con 2 h de anticipación. Transcurrido este tiempo, los monoestratos fueron transfectados con los plásmidos preparados en la forma antes descrita e incubados por 16 h a 37°C. Posteriormente, el medio de transfección se retiró, se cambió por medio fresco y los cultivos se incubaron por 48 h a 37°C. Como control se empleó células CHO tratadas con medio de transfección calcio-fosfato. La evaluación de la eficiencia de transfección fue a través de microscopía confocal (MC) y citometría de flujo (CF).

Para la observación cualitativa de transfección, se desprendió la laminilla de las botellas de poliestireno. Los monoestratos se fijaron con acetona al 80% en H₂O. La tinción (77) fue con anticuerpos policlonales anti-glicoproteína G, obtenidos previamente por inoculación de conejos con una vacuna recombinante (vaccinia-rabia®) y con una de uso humano producida en células vero (Vero-rab®). Estos fueron empleados a una dilución de 1:10 con amortiguador PBS (8g NaCl, 0.2g KCl, 2.89g NaHPO₄.12H₂O, 2.16g NaHPO₄.7H₂O en 1L H₂O) depositando 100 µl/muestra e incubados en cámara húmeda a 37°C por 30'. Tras un lavado con PBS, se empleó 100 µl de anti-IgG de conejo conjugado con fluoresceína como segundo anticuerpo (Cat. AP307F, Bioselec), diluido a una proporción 1:20 con PBS. Tras un nuevo proceso de incubación en cámara húmeda a 37°C se secó a medio ambiente, se adicionó medio de montaje Vectashield (Cat. 125-040-070-027, Dostym) y se realizó la lectura a 488 nm con aumentos de 63 o 40 µm en un microscopio confocal.

Para la determinación cuantitativa por CF (78, 79), las células transfectadas se desprendieron por exposición a tripsina (0.25%) verseno (0.1%) (Cat. EN-004, In Vitro) por 1', eliminando los residuos de esta última por centrifugación a 3500 xG, a 4°C por 10' y seguido de su resuspensión en 1ml de amortiguador PBS adicionado con 0.1% azida de sodio, EDTA 5mM y 2% de SFB. El proceso de tinción (77) fue similar al descrito previamente con algunas modificaciones. Los anticuerpos policlonales y anti-IgG (primer y segundo anticuerpo) se emplearon en las mismas diluciones y adicionaron en dosis de 0.2 ml por muestra, manteniéndose en agitación suave e incubación en refrigeración a 8°C por 1 h. Tras un último lavado por centrifugación, las células se resuspendieron en 1 ml de

solución de paraformaldehído al 1% v/w en amortiguador PBS estéril mantenido a 37°C. Las muestras se mantuvieron en oscuridad a 4°C hasta su análisis. El conteo de células transfectadas fue por expresión logarítmica y conteo de 10000 eventos a un voltaje de 0 a 10V.

TRANSFECCIÓN *IN VIVO*

Tras el proceso de selección *in vitro* de las clonas construidas y la replicación del pC38, se confirmó la capacidad de expresión de algunas de ellas por transfecciones *in vivo*. Para ello, de un panel de 18, se eligieron las que previamente mostraron un eficiente y/o reducido nivel de expresión, siendo estas las identificadas con los números 6, 8, 11, 14, 15, 20, 38 y 39.

1.- Evaluación de clonas construidas.

Se emplearon ratones BALB/C de tres semanas de edad, formando ocho grupos con tres ratones c/u. Cada grupo fue inoculado a nivel de músculo tibial con las clonas 6, 8, 11, 14, 15, 20, 38 y 39 en dosis de 40 µg/0.1 ml de PBS estéril (80). Se colectó muestras sanguíneas de c/grupo a los 30 días posteriores a la inoculación, por corte distal de cola, tras la previa anestesia con Hidroxicloruro de Xilazina (20µg/ml) y Cloruro de Ketamina (500mg/ml), diluidos c/u de ellos a una proporción 1:3 con PBS estéril y en dosis de 0.3 ml/ratón. El suero se obtuvo tras la centrifugación a 1500 xG por 10' de las muestras sanguíneas, haciendo un "pull" con los sueros de cada grupo. Se inactivaron a 57°C por 30' y conservaron en congelación a -20°C hasta la determinación de la respuesta inmune.

Para la evaluación de la inmunidad por western blot, la cepa PV de virus rábico fue cosechada y semipurificada por ultracentrifugación por 2 h a 20000 xG sobre un colchón de sacarosa al 20%. El pellet, fue diluido en PBS hasta alcanzar una

concentración no menor de 50 µg/ml. El virus se desnaturalizó por ebullición durante 5', para su corrimiento en gel de poliacrilamida al 12% (3.5 ml de H₂O destilada, 2.5 ml de Tris-HCl al 1.5M y pH 8.8, 100 µl de SDS al 10%, 4 ml de acrilamida/bisacrilamida al 30%, 50 µl de persulfato de amonio al 10% y 5 µl de TEMED), empleando como control un marcador de pesos moleculares de 201 a 6.600 kDa (Cat. 161-0318, Bio Rad) y el corrimiento se realizó a 15 y 50 mA por 10' y 45' respectivamente (66, 81). Se realizó la electrotransferencia a membrana de nitrocelulosa de 0.2 µm de porosidad (Cat. 1703932, Bio Rad), utilizando como metodología el sistema de emparedado, que consistió en colocar en una rejilla una esponja o fibra sintética, papel filtro, gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa, papel filtro y esponja o fibrapor. El corrimiento se realizó a 40 mA por 1 h (66, 82).

La membrana de nitrocelulosa se cortó en tiras para las pruebas de "western blot" con los sueros de los ratones inoculados con las 8 clonas. El bloqueo de las tiras fue con albúmina sérica bovina al 3%. Las muestras séricas de los ratones se diluyeron en proporción 1:40 con PBS-Tween 20 (solución de lavado) e incubó en agitación con la membrana, a 37°C por 2 h. La tinción fue con inmunoglobulinas anti-IgG de ratón conjugadas con peroxidasa en dilución 1:2000 e incubación en agitación por 1 h a 37°C. El cromógeno empleado fue diaminobenzidina (25 mg de diaminobenzidina, 50 ml de PBS, 50 µl de peróxido de hidrógeno al 30%) con incubación por 10' a 37°C en agitación. Se frenó la reacción por lavado con agua destilada y se dejó secar la membrana a temperatura ambiente (83).

2.- Evaluación de pC38 con o sin la fracción AL27

Para las pruebas *in vivo* de pC38, se formaron tres grupos de diez ratones BALB/C de 3 semanas de edad. A *c/u* de los animales del primer grupo se inoculó con 40 μg de pC38, diluidos en 0.1 ml de PBS estéril, a nivel de músculo tibial. Al segundo grupo se administró la misma dosis de pC38, adicionada con 1.062 $\mu\text{g/ml}$ de fracción AL27. Al tercer grupo (control negativo), se le administró PBS estéril, por misma vía y en dosis de 0.1 ml (80). Cinco ratones de cada grupo se sacrificaron a los tres días posteriores a la inoculación para la toma de biopsias, tinción y observación al microscopio confocal. A los ratones restantes se les mantuvo vivos para determinar la respuesta inmune mediante seroneutralización con reducción de focos fluorescentes (RFFIT), colectando las muestras sanguíneas por corte distal de cola de acuerdo al protocolo descrito previamente, a los 30, 45 y 60 días posteriores a la inoculación.

Para la detección cualitativa por microscopía confocal, a las biopsias de músculo tibial de los ratones inoculados con pC38 con o sin fracción AL27, se les realizaron cortes de aproximadamente 3 mm, seguido de un "squash" sobre laminillas y su fijación con acetona al 80%. La tinción con anticuerpos policlonales y anti-IgG fue similar a la desarrollada en la evaluación cualitativa de las transfecciones *in vitro* de pC38 (77). La eficiencia de transfección plasmídica en los tejidos se realizó por observación al microscopio confocal a 488 nm y con aumentos de 63 o 40 μm .

Con las muestras de suero sanguíneo de los ratones inoculados con pC38 adicionada o no con la fracción AL27, se realizaron pruebas de virus-neutralización con reducción de focos fluorescentes (RFFIT) (84). Se cultivaron

células BHK-21 al 100% de confluencia en microplacas de 96 pozos. Se realizaron diluciones de los sueros desde 1:5 hasta 1:625 y mezclaron con virus rábico cepa PV con título de 10^{-5} TCID_{50%} en dilución 1:400 (± 20 focos fluorescentes/campo ± 7) e incubaron por 1 h a 37°C. Los pozos de la microplaca con células BHK-21 se inocularon con 100 μ l de c/u de las mezclas suero/virus e incubaron por 24 h a 37°C. La microplaca se fijó con acetona al 80% por 30' y la tinción fue con 30 μ l de conjugado antirrábico (Laboratorios Baer ®) diluido en proporción 1:5. La lectura fue mediante microscopio invertido de luz ultravioleta. El título de los sueros se expresó en Unidades Internacionales (UI), utilizando como referencia un suero positivo estándar con 10 UI, donado amablemente por el Dr. Gilberto Cortés (Laboratorios Baer, México DF).

EVALUACIÓN DE VACUNA GÉNICA RÁBICA pC38 EN PERROS

A partir de tres caninos hembra raza Beagle sin antecedentes de vacunación contra la rabia, se obtuvo una colonia de 9 cachorros hembras. Las crías fueron desparasitadas y vacunadas contra diversos agentes comunes (moquillo, parvovirus, leptospirosis) exceptuando rabia. La colonia se mantuvo en cuarentena hasta los seis meses de edad, tiempo en el que los animales fueron separados en grupos de tres para dar inicio a la vacunación experimental.

El inóculo consistió en pC38 en dosis de 40 μ g/animal, adicionada o no con la fracción crotálica AL27 a una concentración de 1.062 μ g/ml (15). Ambos productos fueron diluidos en solución salina estéril a fin de administrar 500 μ l/animal.

Al grupo 1 se administró el plásmido rábico adicionado con la fracción crotálica AL27, el grupo 2 se inoculó con plásmido sin ningún tipo de adyuvante y el grupo

3 actuó como control negativo al que sólo se administró solución salina estéril. La aplicación fue con jeringa hipodérmica distribuyendo el inóculo con diversas punciones en el músculo tibial.

Se tomaron muestras sanguíneas por 12 meses a intervalos de 1 mes e iniciando el día de la administración del inóculo (día 0), colectando un volumen de aproximadamente 5 ml/animal. El suero, se obtuvo por centrifugación de las muestras a 1500 xG por 10' e inactivación a 57°C. Las muestras se mantuvieron en congelación a -20°C hasta la realización del diagnóstico por la técnica de seroneutralización con reducción de focos fluorescentes (RFFIT) descrita previamente (84).

RESULTADOS

SELECCIÓN DE CLONA

En la evaluación de la capacidad de expresión por transfecciones *in vitro* de las 18 clonas de plásmido rábico nacional (números 8, 11, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 29, 34, 38, 39 y 52), se determinó una eficiente expresión en 5 de ellas por microscopía confocal, identificadas con los números 8, 20, 38, 39 y 52. La figura 4 muestra un ejemplo de los niveles de transfección, apreciados cualitativamente en los monoestratos CHO desarrollados a un 80% de confluencia e inoculados con 5 μ l de las clonas plasmídicas 8, 20 y 38 en concentración de 1 μ g/ μ l, mediante una mayor o menor intensidad de fluorescencia.

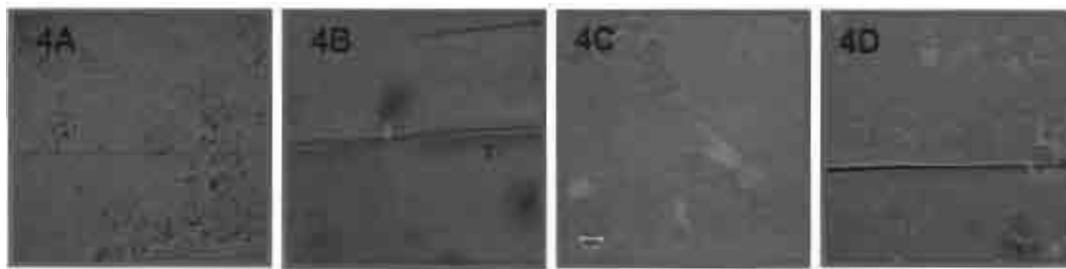


Figura 4.- Selección de clonas de plásmido rábico por Microscopía confocal. Transfección *in vitro* por inoculación de células CHO, con diversas clonas de plásmido rábico nacional y observación cualitativa. La figura 4A muestra el control negativo de células, inoculado con medio de transfección calcio-fosfato. La figura 4B muestra un monoestrato transfectado con 5 μ g de la clona 20, con una baja eficiencia de expresión manifestada por fluorescencia. Las figuras 4C y 4D, corresponden a transfecciones realizadas en la misma condición y dosis, con las clonas 8 y 38 respectivamente. Ambas presentan una positiva y favorable expresión, superando esta capacidad la clona 38 (pC38), tanto en área como en intensidad de fluorescencia.

Al análisis cuantitativo por citometría de flujo de las transfecciones *in vitro* de éstas mismas clonas, se obtuvieron porcentajes de transfección de 9.38, 10.63, 21.8, 22.61 y 26.18% para las clonas 52, 20, 39, 8 y 38 respectivamente, seleccionando así a ésta última para su replicación y empleo en los experimentos posteriores, denominándole a partir de ese momento “pC38”. Los porcentajes de transfección se muestran en la figura 5.

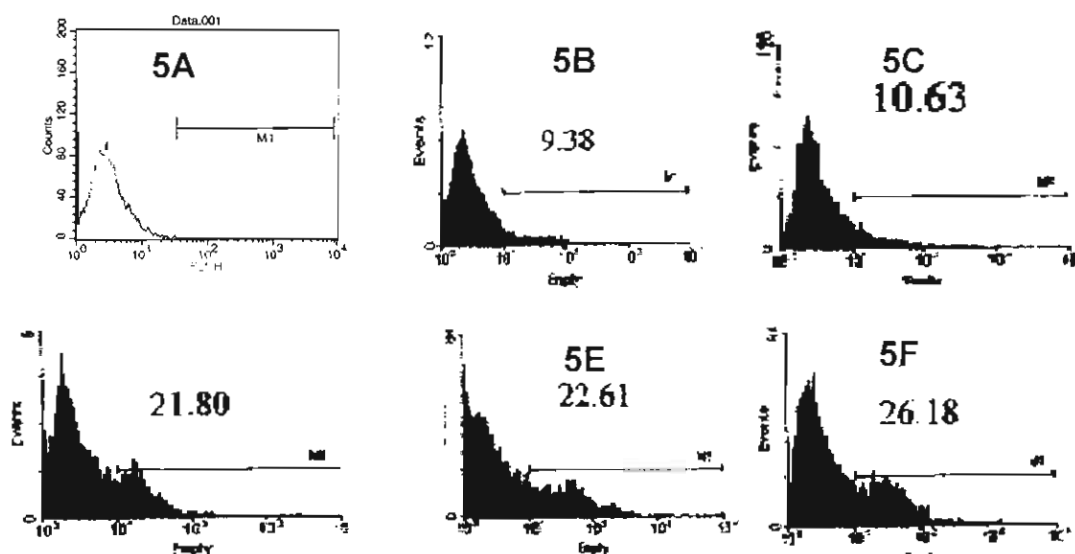


Figura 5.- Selección de clonas de plásmido rábico por Citometría de Flujo. Niveles de expresión de diversas clonas. Transfección *in vitro* bajo el método calcio-fosfato de células CHO desarrolladas al 80% de confluencia, e inoculadas con diversas clonas de plásmido rábico en dosis de 5 μ l, a una concentración de 1 μ g/ml, evaluando la eficiencia por cuantificación porcentual bajo citometría de flujo. La figura 5A muestra células CHO control negativo tratadas únicamente con solución calcio-fosfato. Las figuras 5B a 5F muestran los niveles de expresión obtenidos en las células CHO inoculadas con las clonas 52, 20, 39, 8 y 38 (pC38), con porcentajes de transfección de 9.38, 10.63, 21.80, 22.61 y 26.18% respectivamente.

En la selección *in vivo* de las clonas rábicas, tras la inoculación de ratones con 40 μg las clonas 6, 8, 11, 14, 15, 20, 38 y 39 a nivel de músculo tibial, se determinó la capacidad de expresión del plásmido rábico, de acuerdo con la eficiencia de seroconversión obtenida al análisis de los sueros por western blot. En él, se detectó bandas de reconocimiento antígeno-anticuerpo de mayor intensidad en los sueros correspondientes a los ratones inoculados con las clonas 8 y 38 y de menor intensidad para los sueros portadores de anticuerpos contra las clonas 6, 20 y 39. Lo anterior se muestra en la figura 6, en la que se aprecia una banda única de 69 kDa, bien definida y de mayor intensidad de tinción, indicando una eficiente seroconversión de los ratones hacia pC38 y por consiguiente, la mayor capacidad de expresión de ésta por los tejidos musculares.

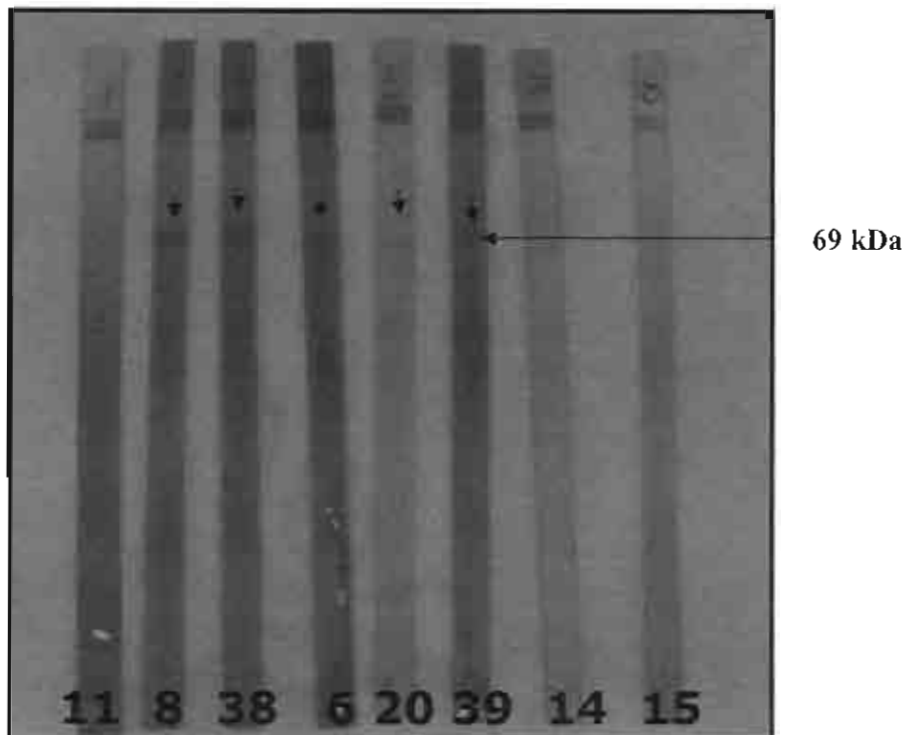


Figura 6.- Selección de clona rábica por estimulación de la inmunidad en ratón. Detección de la respuesta inmune en ratones inoculados con diversas clonas de plásmido rábico, analizadas por pruebas de western blot, a partir de los sueros colectados a los 30 días postinoculación de los grupos de ratones inyectados en músculo tibial, en dosis de 40 μ g, con cada una de las diferentes clonas sujetas al proceso de selección del plásmido rábico. Los sueros correspondientes a los ratones inoculados con las clonas 8 y 38 muestran una clara banda (69 kDa) de reconocimiento antígeno-anticuerpo y/o seroconversión, seleccionando a la número 38 (pC38) por su mayor capacidad de reconocimiento. La formación de la banda de 69 kDa en los sueros de los ratones inoculados con las clonas 6, 20 y 39 fue débil y no se detectó reconocimiento para los sueros correspondientes a los grupos de ratones inoculados con las clonas 11, 14 y 15.

Una vez seleccionada la clona pC38, esta fue replicada y purificada produciendo cinco lotes bajo el protocolo de lisis alcalina modificada, obteniendo cosechas plasmídicas en concentraciones variables, detectadas por espectrofotometría a una longitud de onda de 260 nm y que fueron desde los 959 hasta los 1237 ng/ μ l. El grado de pureza de los lotes de plásmido cosechados, se puede observar en el corrimiento electroforético de las muestras colectada en el proceso y que se ilustra en la figura 7. En ella puede observarse que el DNA eluído de la columna y posteriormente precipitado con el isopropanol (línea 6) se encuentra en gran concentración, libre de impurezas de bajo peso molecular, colorantes, RNA y correctamente desalinizado.

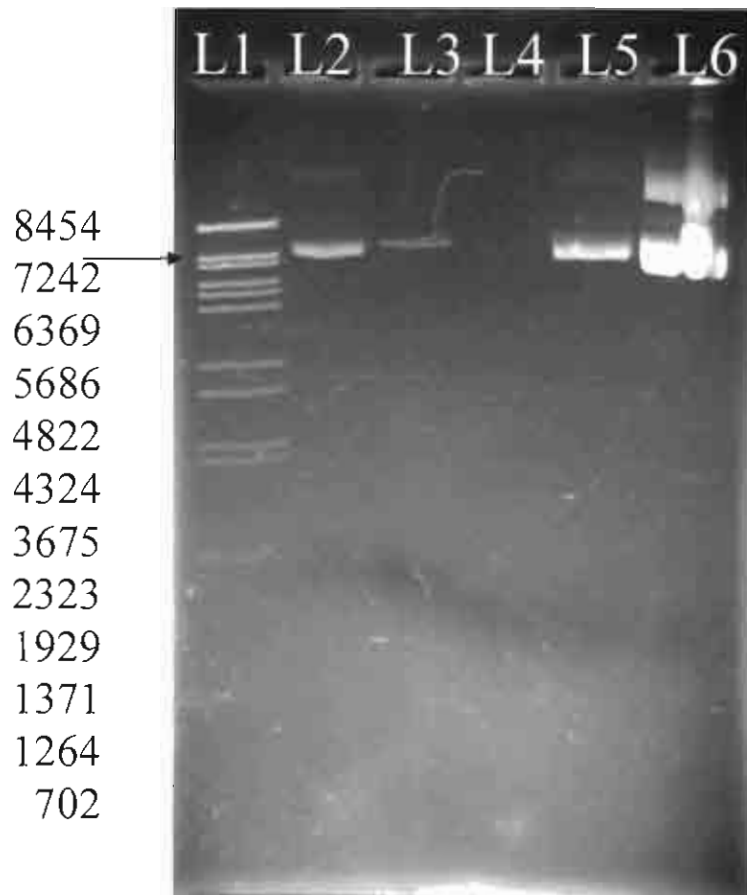


Figura 7.- Comprobación de pureza de la clona pC38 por electroforesis. El carril 1 (L1) contiene el marcador que fue desde los 8454 hasta los 702 pb. Los carriles 2 a 6 (L2 a L6) contienen 5 μ l de c/u de las muestras colectadas en la purificación. Los carriles 2 a 4 indican la retención del DNA de interés en la columna de resina de intercambio aniónico, durante los procesos de lavado, mientras que los carriles 5 y 6 muestran al DNA plasmídico. En el carril L2 se observan impurezas y RNA degradado tras el proceso de lisis. En el L3 se manifiestan trazas de RNA. En el carril L4 se aprecia que la columna está totalmente libre de RNA. El carril L5 contiene al DNA plasmídico puro eluido, y el L6 contiene una alta concentración de DNA plasmídico cosechado tras su precipitación.

OBTENCIÓN DE FRACCIÓN CROTÁLIDA

En el proceso cromatográfico para el aislamiento de la fracción crotálica, el veneno de *A piscivorus* manifestó poseer 15 diferentes polipéptidos, los cuales migraron a tiempos de elusión de 1.1', 1.39', 1.83', 2.11', 2.48', 2.72', 2.99', 3.62', 4.23', 4.92', 5.44', 6.04', 6.79', 7.32' y 8.28' y se presentan en la figura 8 mediante picos, siendo el doceavo, con un tiempo de elusión de 6.04', el polipéptido de interés denominado AL27. Esta fracción se colectó a la proporción de 17 $\mu\text{g/ml}$, por cada 10 mg de veneno completo sometido al proceso cromatográfico.

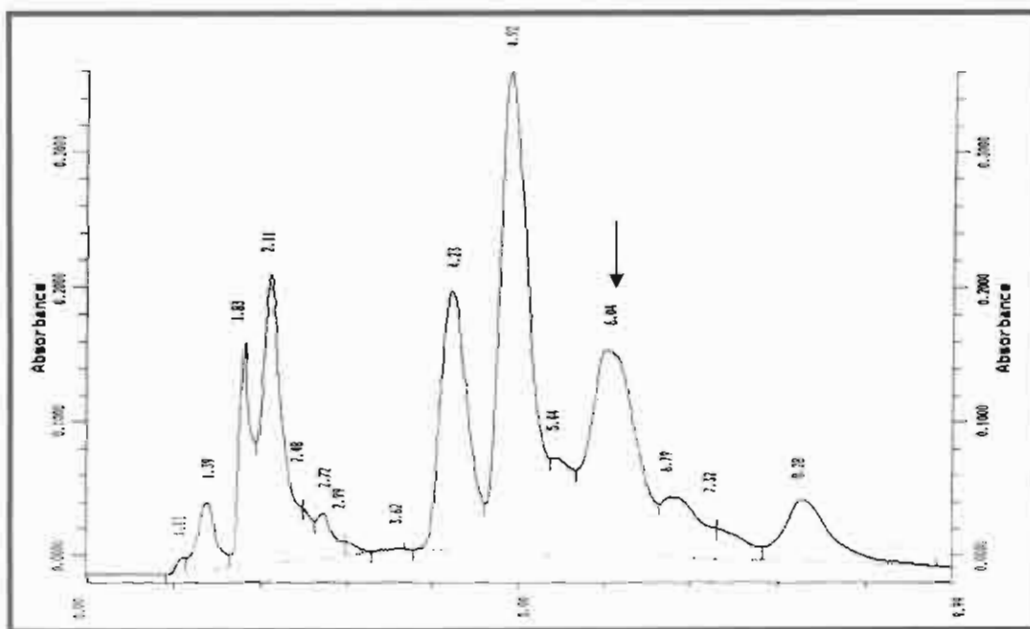


Figura 8.- Aislamiento de la fracción AL27 del veneno de serpiente *Agkistrodon piscivorus*. Gráfica cromatográfica de los 15 diferentes polipéptidos y proteínas presentes en el veneno de *A piscivorus*, manifestados por los picos y tiempos de elusión de cada uno de ellos, durante el proceso de obtención de la fracción AL27 por cromatografía líquida de alta presión-fase reversa (HPLC-RP). El pico doce, con tiempo de elusión de 6.04' es el correspondiente a la fracción con actividad aglutinante denominado AL27.

En las pruebas de actividad biológica, de los 15 polipéptidos y proteínas colectados, sólo la correspondiente al pico 12, manifestó capacidad de aglutinar claramente a los glóbulos rojos de conejo hasta una dilución de 1:64, correspondiente a 64 UH. Las proteínas y polipéptidos restantes mostraron una clara precipitación, al igual que el control negativo, consistente sólo de solución salina y glóbulos rojos. El control positivo, conformado por veneno de *A piscivorus* completo (con todos sus componentes proteicos y polipeptídicos), mostró una marcada aglutinación (Figura 9).

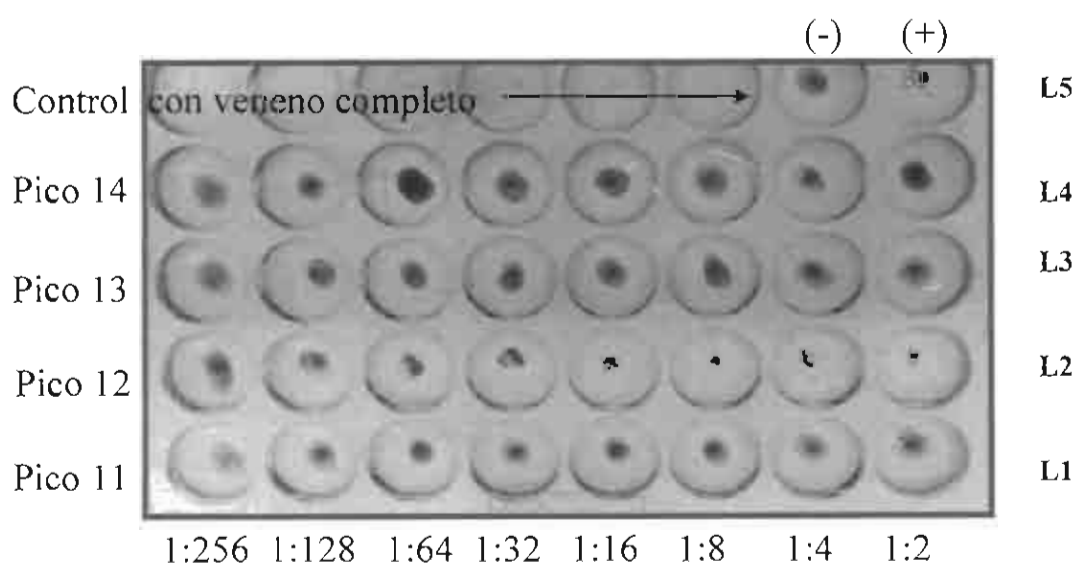


Figura 9.- Actividad hemaglutinante de la fracción AL27. Pruebas de aglutinación de la fracción AL27 con glóbulos rojos de conejo. Las líneas L1 a L4 corresponden a las fracciones (picos) 11, 12, 13 y 14, colectadas por HPLR-RP. La línea L5 contiene de derecha a izquierda los controles positivo (*A piscivorus*, 6.25 mg/ml) y negativo (Sol. salina). La dilución de las fracciones es de derecha a izquierda (1:2 hasta 1:256). La línea L2 (polipéptido o pico doce) muestra aglutinación hasta un nivel de 64 UH (Fracción AL27). Las líneas L1, L3 y L4 muestran precipitación de glóbulos rojos.

FRACCIÓN AL27 COMO FAVORECEDOR DE LA EXPRESIÓN DEL PLÁSMIDO RÁBICO

Una vez cosechados los lotes de pC38 y la fracción AL27, se determinó mediante transfecciones *in vitro* e *in vivo* si AL27 tendría la capacidad de incrementar los niveles de expresión plasmídica. La figura 10 muestra los resultados *in vitro* de la apreciación cualitativa por microscopía confocal, en la que se observa la positividad, por una mayor o menor intensidad de fluorescencia de los monoestratos CHO inoculados con 5 μ l de pC38 a una concentración de 1 μ g/ml, adicionados o no con 1.062 μ g/ml de AL27. Mediante el trazo de una línea que indica el paso de la luz ultravioleta sobre el tejido transfectado y la traducción de esta información en forma gráfica, fue posible apreciar que los niveles de transfección de pC38 cuando es inoculada sola (++) es inferior a la manifestada por las favorecidas por la adición de la fracción AL27 (+++).

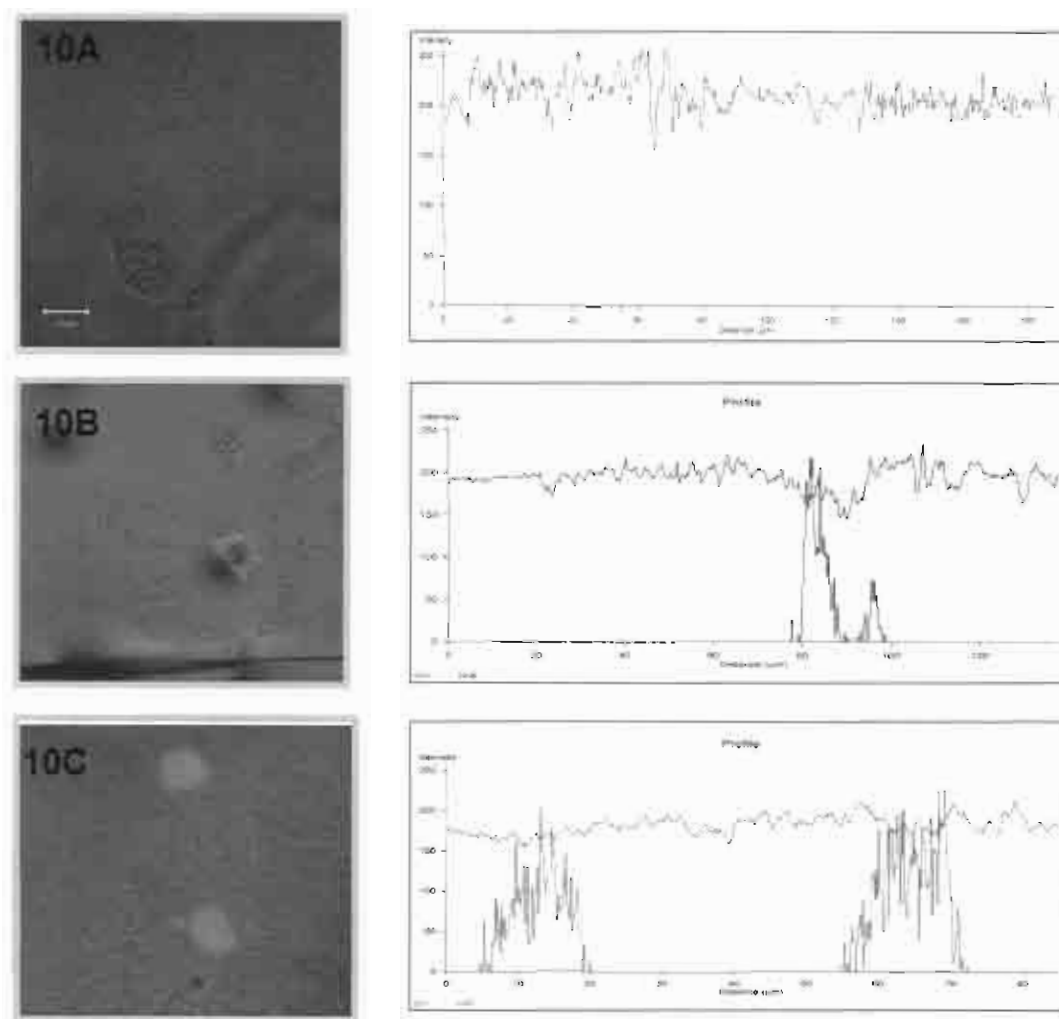


Figura 10.- Incremento de expresión *in vitro* del plásmido pC38 por Microscopía Confocal. Transfección de células CHO bajo el método calcio-fosfato, con 5 μ l de pC38 a concentración de 1 μ g/ μ l, con o sin la adición de 1.062 μ g/ml de AL27. La figura 10A muestra células CHO control negativo, tratadas sólo con amortiguador calcio-fosfato y su gráfica sin fluorescencia. Las 10B y 10C corresponden a monoestratos CHO, inoculados con pC38, sin la fracción AL27 y adicionada con la fracción AL27 respectivamente, en las que la microscopía confocal manifiesta los niveles de transfección por la intensidad de fluorescencia en las gráficas adyacentes, sobresaliendo cualitativamente el empleo de la mezcla pC38/AL27.

La mayor capacidad de transfección de la combinación pC38/AL27 sobre pC38 *in vitro* también fue demostrada mediante citometría de flujo. La figura 11 muestra que cuando 5 μ l de pC38 en dosis de 1 μ g/ μ l, fueron inoculados en los monoestratos CHO, suspendidos sólo en el medio calcio-fosfato, se obtuvo un porcentaje de transfección de 27.78%, mientras que con la adición de 1,062 μ g/ml de la fracción AL27, el nivel se incrementó hasta un 38.66%.

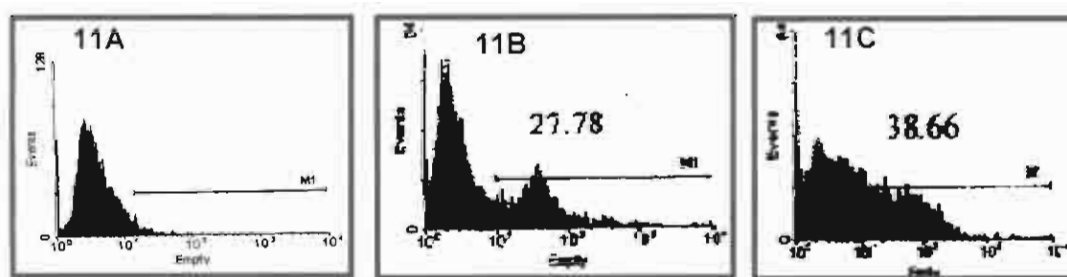


Figura 11.- Incremento de expresión *in vitro* del plásmido pC38 por Citometría de Flujo. Evaluación de la eficiencia de expresión del plásmido pC38, detectada por citometría de flujo y expresada en porcentajes de transfección plasmídica. La figura 11A corresponde al control negativo, consistente en células CHO tratadas con amortiguador calcio-fosfato. La figura 11B, muestra que cuando se administró pC38 en dosis de 5 μ l a una concentración de 1 μ g/ μ l, generó un porcentaje de transfección de 27.78%. Mientras que al empleo de la misma dosis de pC38, mezclada con 1.062 μ g/ml de fracción crotálica AL27, el porcentaje de transfección se incrementó al 38.66% (figura 11C).

Al análisis *in vivo* sobre el incremento en la capacidad de expresión plasmídica por la fracción AL27, los tejidos musculares de ratón inoculados con 40 μg de pC38, adicionada o no con 1.062 $\mu\text{g/ml}$ de AL27 y teñidos con anticuerpos policlonales específicos anti-rabia, mostraron nuevamente en forma cualitativa, por microscopía confocal, la superioridad de la mezcla pC38/AL27 en los niveles de transfección (+++), sobre los tejidos con pC38 resuspendida sólo en PBS (++) . La figura 12 muestra los resultados obtenidos en esta etapa, indicando por un lado, la mayor eficiencia de la combinación pC38/AL27, además de la factibilidad de que el plásmido inoculado sea reconocido e introducido en la membrana de las células musculares, manifestado lo anterior por la marcada fluorescencia a este nivel, mismo que se aprecia en el acercamiento de la unión de las fibras musculares de la figura 12D.

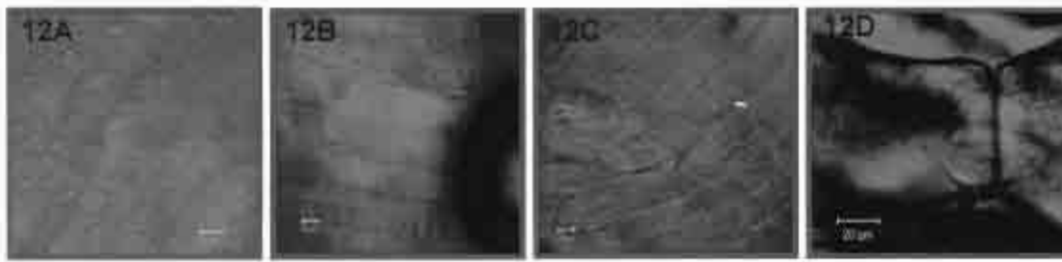


Figura 12.- Incremento de expresión *in vivo* del plásmido pC38 por Microscopía Confocal. Tejidos de músculo tibial de ratones inoculados con 40 μg del plásmido rábico pC38, adicionado o no de 1.062 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la fracción AL27, apreciados cualitativamente por microscopía confocal. La figura 12A muestra el tejido muscular de ratón control negativo. La figura 12B corresponde a tejido muscular de ratón inoculado con pC38, con una eficiente expresión del plásmido rábico. Las figuras 12C y 12D muestran tejidos inoculados con la mezcla pC38/AL27, con una mayor capacidad de transfección. En la 12C se puede apreciar la capacidad de expresión a nivel de membrana celular, mientras que la 12D muestra un acercamiento de la unión de dos células musculares con una marcada fluorescencia a nivel de membrana celular, indicando la presencia y capacidad de transfección de pC38.

Continuando con la evaluación *in vivo* del efecto en la transfección del plásmido rábico por la fracción AL27, se detectó la respuesta inmune inducida en ratón por pC38 en dosis de 40 μg , adicionada o no con 1.062 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de la fracción AL27, mediante seroneutralización con RFFIT. En ella, el grupo control negativo al que se administró 0.1 ml de PBS estéril, en sus tres muestreos séricos, se mantuvo en niveles de 0.2, 0.2 y 0.3 UI/ml (Unidades Internacionales/mililitro). El suero de los ratones inmunizados con pC38, registró seroconversiones con incrementos paulatinos que fueron de 0.75, 0.9 y 1.2 UI/ml, a los 30, 45 y 60 días posteriores a la aplicación del estímulo vacunal, respectivamente. Mientras que los inoculados con la mezcla pC38/AL27, manifestaron producción de anticuerpos en niveles de 1.1 y 1.27 UI/ml para los 45 y 60 días postinoculación, mostrando un ligero incremento, en la estimulación de la respuesta inmune. Lo anterior indica que el plásmido rábico no solo fue reconocido e introducido por las células musculares, sino que también fue expresado y presentado al sistema inmunológico (figura 13).

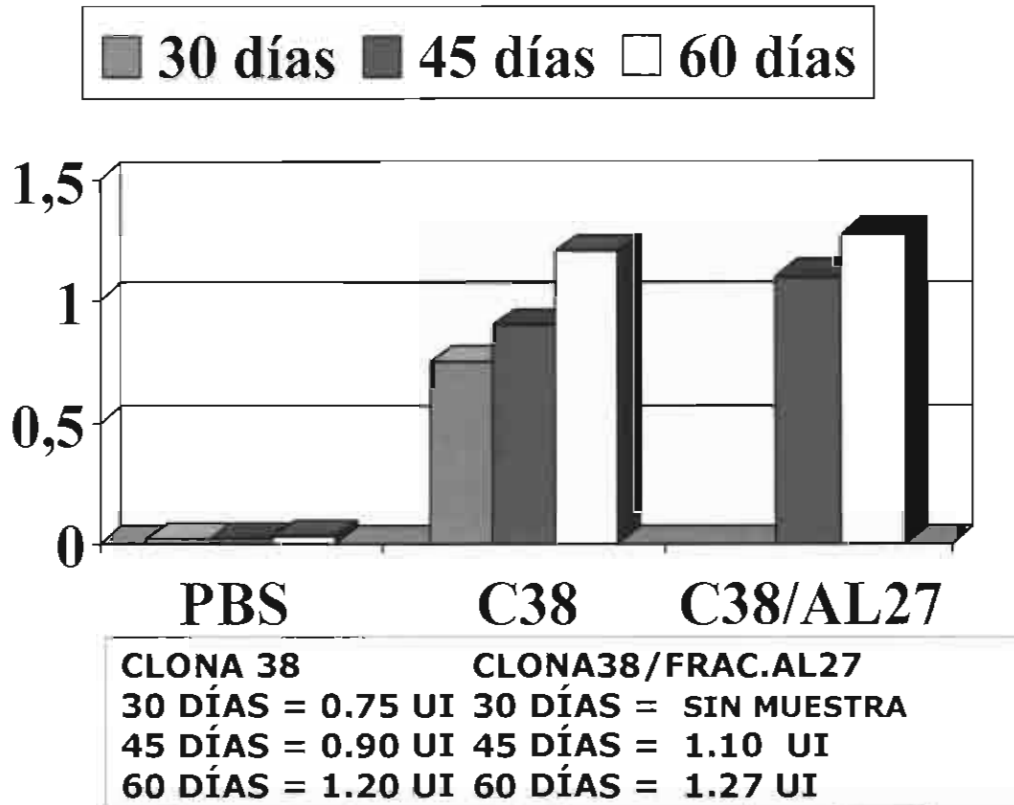


Figura 13.- Respuesta inmune inducida en ratón. Detección por seroneutralización con RFFIT, de los niveles de anticuerpos inducidos por la inoculación de ratones con el plásmido pC38, adicionado o no de 1.062 $\mu\text{g/ml}$ de la fracción AL27. El eje Y indica el título de anticuerpos alcanzados por c/u de los grupos, expresados en (UI). El eje X manifiesta los intervalos de tiempo en que fueron colectadas las muestras séricas. La más alta producción de anticuerpos detectada a los 60 días en el grupo de ratones inoculado con pC38, fue de 1.20 UI/ml, mientras que el grupo vacunado con la misma dosis de pC38 adicionada con la fracción AL27, respondió con una ligera pero mayor inducción de la respuesta inmune, a un nivel de 1.27 UI/ml al día 60 posterior a la aplicación del estímulo.

EVALUACIÓN DE VACUNA GÉNICA RÁBICA EN PERROS

Finalmente, en la evaluación en perros (Figura 14), la potenciación de la vacuna génica contra la rabia por la fracción crotálica AL27 fue satisfactoria. El grupo 1 (inoculado con 40 $\mu\text{g/ml}$ de pC38, adicionado con 1.062 $\mu\text{g/ml}$ de AL27) produjo niveles de anticuerpos ascendentes desde el primer al quinto mes, desde 0.39 UI/ml hasta 2.1 UI/ml, para descender a 1.7 UI/ml al sexto mes y establecerse en 1.6 UI/ml en los 6 meses restantes. El grupo 2 (inoculado pC38 en misma dosis, sin ningún tipo de adyuvante), mostró una respuesta negativa durante todo el experimento, pues sólo se detectó una ligera respuesta de 0.1 a 0.17 UI/ml, nivel que no es satisfactorio, ya que el mínimo requerido es de 0.5 UI/ml, de acuerdo con los requisitos que marca la Organización Mundial de la Salud (OMS). Igualmente, el grupo control, al que sólo se administró PBS estéril, se mantuvo negativo durante el tiempo que duró la evaluación.

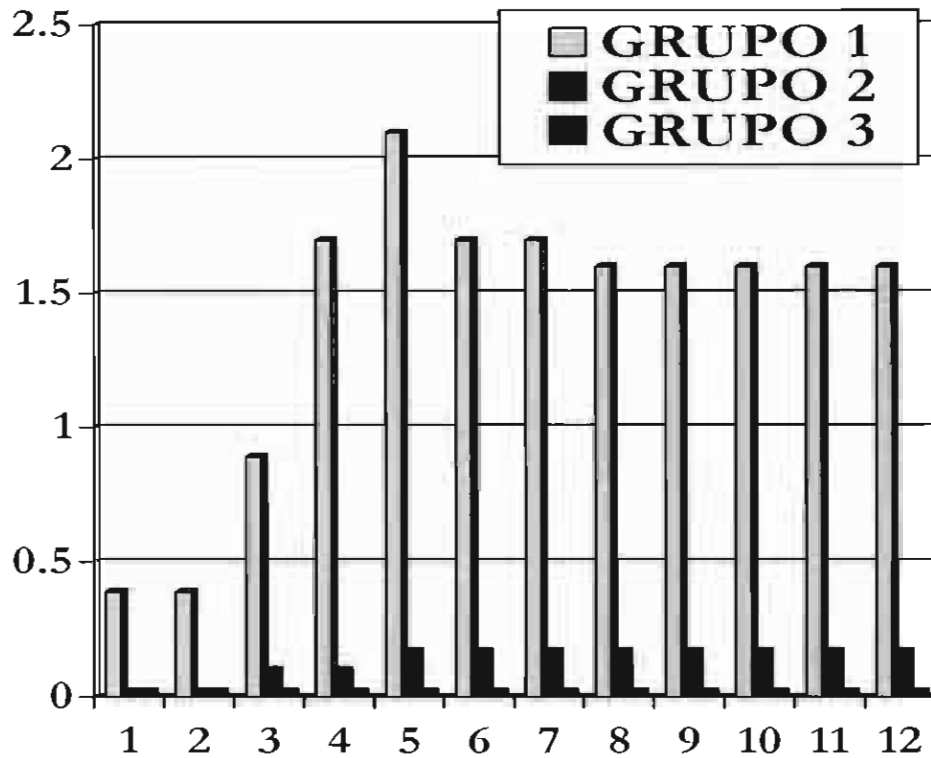


Figura 14.- Respuesta inmune inducida en perros. Niveles de anticuerpos generados por los perros inoculados con el plásmido pC38 en dosis de 40 μg , adicionado o no con la fracción AL27 en dosis de 1.062 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y suspendidos en 500 μl de PBS. El eje X indica el intervalo en meses en que se tomaron las muestras séricas y el eje Y el título de anticuerpos alcanzados en UI/ml. El grupo 1 representa a los perros inoculados con la mezcla pC38/AL27. Se evidencia una eficiente respuesta inmune con niveles al primer mes de 0.39 UI/ml, un máximo de 2.1 UI/ml al quinto mes y estabilización en 1.6 UI/ml en los últimos cuatro muestreos. El grupo 2 corresponde a los perros vacunados con la misma dosis de pC38, sin fracción AL27, en el que no se detectó respuesta al estímulo vacunal (0.17 UI/ml). El grupo 3 pertenece al control negativo, al que sólo se administró PBS estéril (0.020 UI/ml).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos, muestran la efectividad en el empleo de la fracción crotálica AL27, como agente favorecedor de la transfección del vector de expresión no viral para la vacuna génica contra la rabia. No contamos con antecedentes relativos al uso de éste agente como favorecedor de la transfección de genes externos, por lo cual no es factible establecer un análisis comparativo. Sin embargo, existen trabajos realizados con otros agentes químicos (bupivacaína y marciana) y biológicos (proteínas aisladas de venenos de serpiente como la cardiotoxina) con una aparente similitud de acción y que han sido empleados como facilitadores de la transfección de vacunas génicas. De hecho, los antecedentes relacionados con estos productos, fueron el motivo para seleccionar a la lectina del veneno de la serpiente *Agkistrodon piscivorus* (AL27) y proponer su empleo como favorecedor de la transfección de vectores de expresión no viral, eligiendo al mismo tiempo una vacuna génica contra la rabia (plásmido rábico pC38) como modelo experimental.

Se consideró que uno de los probables mecanismos de acción de la fracción crotálica AL27 podría ser similar al de la bupivacaína, quien destruye las miofibrillas musculares, provocando el arribo de macrófagos y la proliferación de células precursoras de mioblastos que se fusionan para formar sincitios (células gigantes multinucleadas), dando origen a una nueva miofibrilla viable (30, 32, 85). Se especula, que el momentáneo daño membranaral que se produce, sería lo que facilitaría la penetración del plásmido portador del gen de interés (pC38), seguido de un incremento en su expresión y por consiguiente en la respuesta inmune.

En el presente trabajo, la mayor fluorescencia de los tejidos musculares inoculados con el plásmido pC38 adicionado con AL27 y capturada en las figuras 12C y 12D, concuerdan con lo reportado por Thomason DB y Booth FW (1990) (86), quienes encontraron incremento en la expresión de los genes β -galactosidasa de *E coli*, en fibras musculares de ratón en proceso de regeneración post-tratamiento con bupivacaína, describiendo expresión difusa dentro de las fibras y expresión focal en el sarcolema. Además, Jin H *et al.* (2004) (32) reporta que el pre-tratamiento de tejido muscular con bupivacaína, incrementa la expresión génica de 30 a 50 veces más, dando como consecuencia una mayor respuesta inmune. Comparativamente, en el presente trabajo, se logró que la inoculación de los perros con la mezcla PC38/AL27, generara una producción superior de anticuerpos, con niveles que rebasaron los requisitos mínimos estipulados por la OMS (0.5UI/ml), con un nivel máximo hasta de 2.1 UI/ml mostrados en la figura 14.

Un segundo mecanismo probable de acción de la fracción AL27 podría ser similar al de la cardiotoxina, presente en el veneno de serpientes elápidas, quienes poseen cierta actividad miotóxica, descrita como una habilidad para romper la membrana plasmática y alterar su función de regular la permeabilidad, permitiendo así el influjo de iones y macromoléculas, además de dilatar el retículo sarcoplásmico, generar cambios en la mitocondria y desorganizar a las miofibrillas (29, 14). Su empleo como favorecedor de la transfección en vacunas génicas contra la rabia, ha generado resultados contradictorios. Mientras Ray NB *et al.* (1997) (87) reporta que con la inoculación intramuscular de cardiotoxina cinco días antes del DNA plasmídico pCMV4CVSG, se incrementó la media geométrica

en títulos de anticuerpos, Bahloul Ch *et al.* (1998) (88) al administrar la cardiotoxina cuatro días antes de los plásmidos pGPV o pGMok, no encontró algún efecto favorable sobre la producción de células Th, ni anticuerpos neutralizantes.

En el presente trabajo, se consideró que la fracción crotálica AL27, al igual que la cardiotoxina, podría alterar la permeabilidad de las células musculares, favoreciendo la entrada del plásmido y subsecuentemente la posterior expresión del DNA intruso. Lo anterior se realizó con cierta seguridad de que AL27 no causaría daño, pues Borkow G *et al.* (1994) (28) al evaluar el efecto de los venenos crotálicos en células endoteliales *in vitro*, encontró que tras el proceso de alteración de las funciones celulares por el efecto miotóxico del veneno, se establece un proceso de regeneración, mantenimiento de la viabilidad celular y capacidad de replicación. Además, en un trabajo previo realizado por nuestro equipo, al aislar por primera vez la fracción AL27 del veneno de la serpiente *Agkistrodon piscivorus*, se demostró tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*, la permanencia de la viabilidad celular y el no daño de tejidos musculares post-tratamiento (29).

Un tercer mecanismo probable de acción de la fracción AL27 podría estar dado por el reconocimiento y unión de la lectina crotálica (también llamada hemaglutinina) con receptores ácido sialico celulares, actuando en este caso, como un agente acarreador del plásmido rábico. Lo anterior es respaldado por otros trabajos, en los que se reporta que las lectinas tipo C (calcio dependientes) muestran una alta afinidad por este tipo de receptores (20, 89) y sus sitios de unión conformados por azúcares, facilitan su entrada al interior de la célula (14).

Sea cual fuere el mecanismo celular disparado por la fracción AL27 en el favorecimiento de la transfección del plásmido rábico, se logró el objetivo de descubrir un nuevo agente facilitador de entrada de vectores de expresión no viral, susceptible de emplearse en vacunas génicas, con la finalidad de incrementar el nivel de la respuesta inmune y/o terapia génica.

En relación a la metodología empleada en el aislamiento de la fracción AL27, los resultados obtenidos bajo el proceso de HPLC-RP, fueron similares a los reportados previamente por este equipo (15), colectando 17 μg de fracción AL27 por cada 100 μg de veneno crudo de *Agkistrodon piscivorus*. La cosecha fue superior a la publicada por Komori *et al.* (1999) (22), quien obtuvo rendimientos de 5 μg de lectina por cada 100 μg de veneno procesado bajo el mismo método. La diferencia pudo ser por diversas causas, debiendo considerarse que los solventes hidrofóbicos (acetonitrilo) que se emplean en la elusión, pueden alterar la estructura terciaria de las proteínas, además de la persistencia de éstas en la columna hidrofóbica.

En el presente trabajo, el tiempo de elusión fue de 10', mientras que Komori *et al.* requirió de 20', pudiendo alterar y/o reducir la actividad biológica de la lectina (72) e influir en una menor detección. Otro punto a considerar, es que el aislamiento se realizó directamente por HPLC-RP, mientras que Komori *et al.* extrajo previamente la lectina en columna sephadex G-50, la eluyó con lactosa al 0.1M y finalizó con su aislamiento y purificación por HPLC-RP. Es factible, que la unión lactosa/lectina no pudo escindirse totalmente y hubiese un efecto de bloqueo de los radicales, reduciendo la afinidad de las proteínas hacia la columna y como consecuencia, la pérdida de una parte del producto. En un ensayo previo,

enfocado en el aislamiento de la fracción AL27, los presentes autores (datos no publicados), indujeron la unión glóbulos rojos de conejo/fracción AL27 y recuperación de ésta última, al escindir los componentes por adición de CaCl_2 . La recuperación del producto, fue con pérdida parcial de la fracción, detectada por disminución de la actividad hemaglutinante de 64 a 8 UH.

Por otra parte, Ferreira *et al.* (1995) (90), al aislar la fracción F (con actividad de quinina) del veneno crudo de *Agkistrodon piscivorus* por HPLC, obtuvo un patrón similar, más no idéntico, en los picos y tiempos de elusión de los componentes proteicos reportados en el presente trabajo (figura 5). Esto pudo ser debido a que empleó una columna C_8 , apta para retención de péptidos de peso molecular \leq a 20000, mientras que en el presente trabajo se contó con una C_{18} , útil para péptidos de peso molecular \leq a 5000. Además, como solvente B empleó metanol al 80% con 0.005 g de acetato de amonio y éste, aunque es un buen modificador orgánico, es más apto para la separación de polipéptidos y tiene una pequeña desventaja ante los solventes más comunes (72), como el acetonitrilo.

La actividad hemaglutinante de la fracción AL27 fue de 64 UH, similar a la obtenida previamente (15) y diferente a la reportada por Ogilvie y Gatner (1984) (18), con un nivel de aglutinación de 16 UH, y por Komori *et al.* (22), con un mínimo de actividad a la concentración de 0.21 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de lectina (8 UH aprox.). La disparidad no es de extrañarse, ya que de acuerdo con Johnson *et al.* (1987) (91), la actividad biológica de los venenos, aún colectados de un mismo individuo, puede variar debido a la coloración, dada por la presencia o ausencia de la enzima L-aminoácido oxidasa (Dos Santos *et al.*, 1993) (92), y a la frecuencia de colección del veneno.

Por otra parte, la estrategia para determinar el nivel de transfección de pC38 *in vitro*, bajo un método bioquímico y posterior tinción con anticuerpos monoclonales marcados con fluoresceína, fue similar más no idéntica, a la realizada por Osorio *et al.* (1999) (53), quien al evaluar la vacuna génica contra la rabia con el plásmido pCMV-intA en células BHK (células de riñón de hámster) empleó un kit consistente en lípidos catiónicos, mientras que en el presente trabajo la transfección fue en células CHO y mediada por un amortiguador calcio/fosfato. El mecanismo de acción de éstos es diferente, mientras el calcio/fosfato forma coprecipitados insolubles con el DNA y se une a la superficie celular para ser adsorbido por endocitosis, los lípidos crean vesículas membranales artificiales que se adhieren y fusionan a la membrana celular cargada negativamente (75). Independientemente al sistema empleado, el resultado fue positivo en ambos trabajos, ya que fue posible confirmar la eficiencia de transfección del plásmido pC38 en una forma cualitativa.

La determinación cuantitativa de transfección plasmídica *in vitro*, ha sido estudiada más ampliamente en células dendríticas (CD), y dependiendo del sistema empleado como: liposomas, dendrímeros, micropartículas acarreadoras, electroporación, etc., los porcentajes de expresión reportados oscilan entre el 1 y el 16%, y con la nucleoporación se ha logrado incrementos hasta de un 60% (93). En transfecciones transitorias *in vitro* con plásmido rábico, Xiang Z Q *et al.* (94), cuantificó la expresión de los plásmidos pSG5.lacZ y pCG5.lacZ en células BHK-21 y reportó niveles de expresión de 7.6% y 10.2%, para cada uno de ellos. En el presente trabajo, el máximo nivel de expresión fue de 38.66% con la mezcla pC38/fracción AL27, lo cual pudo ser atribuido al favorecedor de la transfección

empleado, así como por la selección de la línea celular (CHO) y los tiempos de incubación dados en el sistema calcio-fosfato (76).

Se tiene conocimiento, que la eficiencia de expresión difiere de acuerdo a la línea celular empleada. Además, de que los bajos índices de transfección e intoxicación de las células, son consecuencia de incubaciones prolongadas a medio ambiente (95). De hecho, la efectividad de la expresión génica también depende de otros factores como: la liberación del DNA intracelular, la estabilidad del DNA en el citoplasma, el desempaquetamiento del complejo DNA-vector y la entrada del DNA en el núcleo (96). Por otra parte, se debe considerar, que el detectar un elevado índice de captura de DNA por la célula, no es indicativo de un mayor nivel de expresión, ya que de acuerdo con el trabajo realizado por Batard P *et al.* (2000)(97), la elevada captura de plásmido, decrece la supervivencia celular y reduce la proliferación de células sobrevivientes. El autor reporta, que sólo el 20 a 33% de las colonias que expresan los plásmidos, son capaces de proliferar y mantener un porcentaje significativo ($\geq 5\%$) de expresión celular. Los altos porcentajes de expresión obtenidos en el presente trabajo, aparentemente no afectaron la viabilidad celular, ni los niveles de expresión del plásmido pC38, ya que al análisis *in vivo* en el perro, la estimulación de la respuesta inmune perduró durante los doce meses que duro el experimento.

En cuanto al favorecimiento de la expresión del DNA de la vacuna génica contra la rabia, por la fracción crotálica AL27 como facilitador del mecanismo de transfección, en el presente trabajo se obtuvieron resultados satisfactorios. La evidencia de este logro, no solamente está plasmada a nivel experimental a través de los estudios de transfección realizados *in vitro* y/o *in vivo* en animales de

laboratorio, sino que en este caso, se llevaron hacia la principal especie transmisora de la rabia a humanos, el perro, logrando obtener niveles de respuesta inmune superiores (2.1 UI/ml) a los estipulados en los requerimientos marcados por la OMS (0.5 UI/ml) y comparables con la respuesta obtenida al administrar el plásmido pC38 sólo (máximo 0.17 UI/ml), misma que no cumplió con el nivel mínimo de inmunogenicidad.

Actualmente, existe una gran cantidad de reportes de vacunas génicas a nivel experimental sobre una diversidad de agentes virales, bacterianos, etc. La mayoría, son llevados a cabo en animales de laboratorio con excelentes resultados, pero sólo unos cuantos, son realizados en las especies mayores y por lo general, no reportan buenos niveles de protección (98), a menos que se empleen grandes dosis de DNA que produzcan cantidades suficientes de antígeno.

En el caso de vacunas de DNA contra la rabia, como referencia tenemos el estudio realizado por Perrin *et al.* (2000) (54), quien empleando un plásmido construido con el gen que codifica para la glicoproteína G de la cepa Pasteur e insertado en el vector pCLneo (pGPV), reportó resultados muy alentadores en perros Beagle. Aplicó un estímulo con 100 μ g de pGPV en músculo tibial y obtuvo un rd= 95 (dilución sérica recíproca que inhibe el 50% de focos fluorescentes. Se considera que un rd = 40 es el recíproco a 0.5 UI/ml) al día 28 postinoculación, con incremento a la administración de un refuerzo. Al desafío, los animales estaban totalmente protegidos.

Al comparar los resultados de Perrin *et al.* con los del presente trabajo surge la cuestión ¿por que razón no se obtuvo inmunidad en los perros inoculados con el

plásmido pC38 sólo?. Tal vez la respuesta está en la dosis. Perrin *et al.* aplicó una dosis superior (100 µg) a la empleada en el presente trabajo (40 µg), además de que los niveles de respuesta los incrementó con la aplicación de un refuerzo, aportando una dosis total de 200 µg/animal. Por otra parte, también es importante recordar, que las vacunas génicas, se han distinguido por ser poco inmunogénicas, debido principalmente a la insuficiente entrada celular del DNA desnudo en presencia de sales (56), o a la baja eficiencia de transfección por carencia de señales de reconocimiento de importancia (57).

En otro estudio, Osorio *et al.* (1999) (53) también evaluó una vacuna génica contra la rabia en perros Beagle, empleando en este caso un plásmido construido por la inserción del gen que codifica para la glicoproteína G de un CVS de rabia en el vector pCMV (pCMV-int A-rabia), aplicando dos estímulos de 100 µg por diferentes rutas, obteniendo con la vía intramuscular (im) la mejor respuesta. En contraste, Lodmell *et al.* (2003) (37) aplicando dos estímulos de un plásmido similar (pCMV4) en dosis de 100 µg en perros Beagle, encontró que la vía intradérmica (id) inducía altos títulos de anticuerpos y que por la vía im éstos eran mínimos y/o indetectables. En ambos trabajos, nuevamente se evidencia la necesidad de emplear una gran cantidad de DNA para que la vacuna genere inmunidad satisfactoria.

En relación a vías de inoculación, hay una gran diversidad de opinión en trabajos realizados con otros agentes virales, teniendo como ejemplo que con el rotavirus del ratón (99) y el herpesvirus bovino-I (BHV-1) (100), la ruta id y el uso de pistola génica son superiores a la vía im.

Hanlon *et al.* 2002 (101), al estudiar otra vacuna génica contra la rabia en perros Beagle, administró con pistola génica un estímulo con el plásmido pCMV4 insertado con el gen que codifica para la glicoproteína G de un CVS rábico, en dosis de 20, 40 y 60 μg de DNA, estableciendo una comparación de su eficiencia por la vacunación de un grupo más con una vacuna comercial tradicional y realizando un desafío con una cepa silvestre (perro/coyote de Texas). En él, todos los animales inoculados con la dosis de 20 μg de DNA desarrollaron rabia y sólo el 40%, 60% y 80 % de los perros inmunizados con 40 μg , 60 μg de DNA y vacuna tradicional respectivamente, sobrevivieron al desafío, concluyendo que la administración del DNA mediante pistola génica, además de estresar y lastimar innecesariamente a los animales, no proporcionó una protección equivalente o superior al desafío letal con el virus de la rabia y fue significativamente inferior a una simple dosis de vacuna comercial inactivada, administrada por vía im. Hanlon *et al.*, al igual que en el presente trabajo, empleó dosis muy bajas de DNA, el cual a pesar de haber sido administrado con pistola génica, no proporcionó una eficiente protección al desafío.

Además de la dosis de DNA y vía de inoculación, existe otro factor a considerar que podría justificar la diferencia, entre los experimentos previos y el presente trabajo, al empleo de pC38 sin el agente facilitador de la transcripción, y este es el tipo de promotor y tipo de gen que codifica para la glicoproteína G insertada. Actualmente, la mayoría de las vacunas génicas son construidas con los promotores virales CMV o SV40 y ambos difieren en su especificidad de tejidos y en su eficiencia para la síntesis del mRNA (94).

Xiang *et al.* 1995 (94), al reemplazar al promotor SV40 por el promotor temprano CMV en una vacuna génica contra la rabia, encontró que la proteína G no era expresada en células de fibroblastos de ratón o en BHK-21. Sin embargo, ambos promotores (SV40 y CMV), en los estudios *in vivo* indujeron respuestas inmunes similares, concluyendo que las transfecciones *in vitro* no necesariamente se correlacionan con la eficacia *in vivo*.

Tordó *et al.* (2002) (102), reportó que cuando el gen que codifica para la glicoproteína G de la cepa PV es insertada en el vector pCLneo (con SV40 como señal de poliadenilación y CMV como promotor), brinda un mejor nivel de protección que el plásmido pCMV4, el cual contiene el gen que codifica para la glicoproteína G proveniente de una cepa de CVS rábico (equivalente). Tesoro *et al.* (2006) (103), al empleo de un plásmido rábico en el que insertó el gen que codifica para la glicoproteína G en el vector pCLneo, también obtuvo un eficiente nivel de protección.

En el presente trabajo, el vector y la cepa viral empleados fueron similares a los referidos por Tordó *et al.* y Tesoro *et al.*, por lo que se esperaba que a la administración de pC38 sin el agente favorecedor de la transfección, se obtendrían resultados positivos, lo cual no sucedió. Sin embargo, también es importante considerar que la construcción de los plásmidos no fue idéntica y que la amplitud (spacing) entre el promotor y el gen insertado y la presencia de secuencias extras (consensus) al inicio del codón, influyen en la eficiencia de transcripción (94).

Las opiniones antes vertidas también son respaldadas por trabajos realizados con otros agentes virales. Van Drunen *et al.* (1998)(100), al evaluar una vacuna de

DNA en ganado bovino contra el BHV-1, realizó el cambio del promotor RSV (virus de sarcoma de Rous) por el HCMV (citomegalovirus humano) y encontró finalmente, que en los bovinos inoculados con el gen *gD* insertado en el promotor HCMV, los títulos se incrementaron dos a tres veces más.

Es un hecho, que la fracción AL27 logró actuar como un agente facilitador de la transfección de vectores de expresión no viral, y que contribuyó a la expresión del gen que codifica para la glicoproteína G del virus de la rabia, en condiciones *in vitro* como *in vivo*. Por lo tanto, es factible que pueda ser empleado para mejorar la eficacia de las vacunas y terapia génica. Sin embargo, aún quedan varios factores por resolver, como el corroborar los mecanismos de acción disparados en la célula huésped por la fracción AL27, así como estudios de secuenciación de dicha proteína, para su producción a gran escala.

LITERATURA CONSULTADA

1. - Weber E, Anderson WF, Kasahara N. Recent advances in retrovirus vector-mediated gene therapy: teaching an old vector new trick. *Curr Opin Mol Ther* 2001;3:439-453.
- 2.- Sarricolea EML, Garcia-Noblejas FMP. *Biología: Aplicaciones y problemas éticos*. CB 1998;35(3):547-556.
3. - Judge A, McClintock K, Phelps JR, MacLachlan I. Hypersensitivity and loss of disease site targeting caused by antibody responses to PEGylated liposomes. *Molecular Therapy* 2006;13(2):328-337
4. - McKnight S, Tjian R. Transcriptional selectivity of viral genes in mammalian cells. *Cell* 1986;46:795-805.
5. - Raki M, Rein DT, Kanerva A, Hemminki A Gene transfer approaches for gynaecological diseases. *Molecular Therapy* 2006;14(2):154.
6. - Friedmann T. Problemas de la terapia génica. *Investigación y ciencia* 1997;251:44-50.
7. - Rowe HM, Lopes L, Ikeda Y, Bailey R, Barde I, Zenke M et al. Immunization with a lentiviral vector stimulates both CD4 and CD8 T cell responses to an ovalbumin transgene. *Molecular Therapy* 2006;13(2):310-319.
8. - Spitz M, Velikovsky CA, Cassataro J, Giambartolomei GH. Factores adyuvantes de las vacunas de ADN. *Medicina* 2002;62(1):99-102.
9. - Khan AS, Draghia-Akli R. Improvement of electroporation devices and methods for use with plasmid based therapeutics and DNA vaccine applications in small and large animals. *Molecular Therapy* 2005;11(1):S74, 190.

10. - Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Annu Rev Immunol* 1997;15:617-648
11. - Brondyk WH. The pCL-neo mammalian expression vector. *Promega notes magazine* 1995;51:10-15
12. - Yamashita M, Ito T, Iida-Tanaka N, Koyama Y. Transcription activating effect of the synthetic water soluble polyampholytes. *Molecular Therapy* 2005;11(1):S89, 226.
13. - Harris JD, Lemoine NR. Strategies for targeted gene therapy. *Technical Focus, TIG* 1996;12(10):400-405.
14. - Manjunatha RK, Evans HJ. Effects of snake venom proteins on blood platelets. *Toxicon* 1990;28(12):1387-1422.
15. - Alvarado IA, De Paz VO, León CY, Aguilar SA. Obtención de una fracción crotálica con actividad hemoaglutinante y evaluación in vivo e in vitro del probable daño a tejidos. *Téc Pecu Méx* 2004;42(2):247-260.
16. - Untitled Document. <http://www.Kingsnake.com/toxinology/venomtypes.html>. 2001.
17. - Gartner TK, Stocker K, Williams DC. Thrombolectin: a lectin isolated from *bothrops atrox* venom. *Febs Letters* 1980;117(1):13-16.
18. - Ogilvie ML, Gartner TK. Identification of lectins in snake venoms. *J Herpetol* 1984;18:285-290.
19. - Gartner TK, Ogilvie ML. Isolation and characterization of three Ca⁺⁺ dependent β -galactoside-specific lectins from snake venoms. *Biochem J* 1984;224:301-307.

20. - Drickamer K. Two distinct classes of carbohydrate-recognition domains in animal lectins. *The Journal of Biological Chemistry* 1988;263(20):9557-9560.
21. - Cambi A, de Langue F, van Maarseveen N, Nijhuis M, Joosten B, van Dijk EMHP, *et al.* Microdomains of the C-type lectin DC-SIGN are portals for virus entry into dendritic cells. *The Journal of Cell Biology* 2004;164(1):145-155.
22. - Komori Y, Nikai T, Tohkai T Sugihara H. Primary structure and biological activity of snake venom lectin (APL) from *Agkistrodon p piscivorus* (Eastern cottonmouth). *Toxicon* 1999;37(7):1053-1064.
23. - Sharon N, Lis H. Lectins: Cell-agglutinating and sugar-specific proteins. *Science* 1972;177:949-959.
24. - Helmbold W, Prokop O, Uhlenbruck G, Böhmer G, Lütticken R. Snake venom lectins: a new group of T and B cell mitogenic anti-galactans. *Biomedica Biochemical Acta* 1985;44(11-12):K91-K96.
25. - Ogilvie ML, Byl JW, Gartner TK. Platelet aggregation is stimulated by lactose inhibitable snake venom lectins. *Thrombosis and Haemostasis* 1989;62(2):704-707.
26. - Lomonte B, Rojas G, Gutiérrez JM, Ramírez G. Isolation of a galactose-binding lectin from the venom of the snake *Bothrops godmanie* (Godmann's pit viper). *Toxicon* 1990;28(1):75-81.
27. - Hayakawa T, Niikawa T, Kishida A, Akashi M, Baba M. Capture of HIV-1 gp120 and virions by lectin-immobilized poly-styrene nanospheres: Potential approach toward prevention of HIV-infection. *Antiviral Research* 1995;27(1-2):49-57.

28. - Borkow G, Lomonte B, Gutiérrez JM, Ovadia M. Effect of various viperidae and crotalidae snake venoms on endothelial cells *in vitro*. *Toxicon* 1994;32(12):1689-1695.
29. - Gutiérrez JM, Cerdas L. Mecanismos de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. *Rev Biol Trop* 1984;32(2):213-222.
30. - Haseett DE, Whitton JL. DNA immunization. *Trends in Microbiology* 1996;4(8):307-312.
31. - Warren HS, Vogel FR, Chedid LA. Current status of immunological adjuvants. *Annu Rev Immunol* 1986;4:369-475.
32. - Jin H, Li Y, Ma Z, Zhang F, Xie Q, Gu D, *et al*. Effect of chemical adjuvants on DNA vaccination. *Vaccine* 2004;22(21-22):2925-2935.
33. - King AA, Turner GS. Rabies: a review. *J Comp Pathol* 1993;108:1-39.
34. - WHO. World Health Organization 2005. Human and animal rabies. <http://www.who.int/rabies/en/>
35. - Rupprecht CE, Smith JS, Fekadu M, Childs JE. The ascension of wildlife rabies :a cause for public health concerns or intervention ?. *Emerging Infect Dis* 1995;1:107-114.
36. - Boletín: Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas. Organización Panamericana de la Salud (OPS) 2001;XXXIII:1-41.
37. - Lodmell DL, Parnell MJ, Weyhrich JT, Ewalt LC. Canine rabies DNA vaccination: a single-dose intradermal injection into ear pinnae elicits elevated and persistent levels of neutralizing antibody. *Vaccine* 2003;21(25-26):3998-4002.
38. - Lodmell DL, Ewalt LC. Post-exposure DNA vaccination protects mice against rabies virus. *Vaccine* 2001;19(17-19):2468-2473.

39. - Dutta JK. Rabies prevention: cost to an Indian Labourer. J Am Med Assoc 1996;276:32 letters
40. - Lodmell DL, Esposito J, Ewalt LC. Live vaccinia rabies virus recombinants, but not an inactivated rabies virus cell culture vaccine, protects B-lymphocyte-deficient A/WySnJ mice against rabies: consideration of recombinant defective poxviruses for rabies immunization of immunocompromised individuals. Vaccine 2004;22(25-26):3329-3333.
41. - Schneider LG. Rabies virus vaccines. Dev Biol Stand 1995;84:49-54.
42. - Rudmann DG, Van Alstine WG, Doddy F, Sandusky GE, Barkdull T, Janovitz EB. Pulmonary and mediastinal metastases of a vaccination-site sarcoma in a cat. Vet Pathol 1996;33:466-469.
43. - Bingham J, Kappeler A, Hill FWG, King AA, Perry BD, Foggin CM. Efficacy of SAD(Berne) rabies vaccine given by the oral route in two species of jackal (*Canis mesomelas* and *Canis adustus*). J Wildlife Dis 1995;31:416-419.
44. - Aubert MFA, Masson E, Artois M, Barrat J. In: CE Lyssaviruses, B. Rupprecht, X Dietzschold and H Koprowski, Editors, Oral Wildlife Rabies Vaccination Field Trials in Europe with Recent Emphasis on France, Springer, Berlin.1994;19-243.
45. - Rupprecht CE, Charlot KM, Artois M, Casey GA, Webster WA, Cambell JB, *et al.* Ineffectiveness and comparative pathogenicity of attenuated rabies virus vaccines for the striped skunk (*Mephitis mephitis*) J Wildlife Dis 1990;26:90-102
46. - WHO Report of the 4th WHO consultation on oral immunization of dogs against rabies, Geneva 1993; WHO/RabRes/93.42.

47. - Bingham J, Foggin CM, Gerber H, Hill FWG, Kappeler A, King AA, *et al.* Pathogenicity of SAD rabies vaccine given orally in chacma baboons (*Papio ursinus*). *Vet Rec* 1992;131:55-56.
48. - Orciari LA, Niezgoda M, Hanlon CA, Shaddock JH, Sanderlin DW, Yager PA, *et al.* Rapid clearance of SAG-2 rabies virus from dogs alters oral vaccination. *Vaccine* 2001;19(31):4511-4518.
49. - Morimoto K, McGettigan JP, Foley HD, Hooper DC, Dietzschold B, Schnell MJ. Genetic engineering of live rabies vaccines. *Vaccine* 2001;19(25-26):3543-3551.
50. - Bahloul Ch, Ahmed SBH, B'chir BI, Kharmachi H, Hayouni EA, Dellagi K. Post-exposure therapy in mice against experimental rabies: a single injection of DNA vaccine is as effective as five injections of cell culture-derived vaccine. *Vaccine* 2003;22(2):177-184.
51. - Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: Immunology, application and optimization. *Annu Rev Immunol* 2000;18:927-974.
52. - Anilionis A, Wunner WH, Curtis PJ. Structure of the glycoprotein gene in rabies virus. *Nature* 1981;294:275-278.
53. - Osorio JE, Tomlinson CC, Frank RS, Haanes EJ, Rushlow K, Haynes JR *et al.* Immunization of dogs and cats with a DNA vaccine against rabies virus. *Vaccine* 1999;17:1109-1116.
54. - Perrin P, Jacob Y, Aguilar-SA, Loza-RE, Jallet C, Desmezieres *et al.* Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine* 2000;18:479-486.

55. - Ertl HC, Verma P, He Z, Xiang ZQ. Plasmid vectors as anti-viral vaccines. *Ann N Y Acad Sci* 1995;772:77.
56. - Bos GW, Kanellos T, Crommelin DJA, Hennink WE, Howard CR. Cationic polymers that enhance the performance of HbsAg DNA in vivo. *Vaccine* 2004;23(4):460-469.
57. - Gander B. Trends in particulate antigen and DNA delivery systems for vaccines. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005;57(3):321-323.
58. - Leclerc C. New approaches in vaccine development. *Comp Immunol Microb and Infect Diss* 2003;26(5-6)329-341.
59. - Gujhashi K, Koga T, van Ginkel FW, Hagiwara Y, McGhee JR. A dilemma for mucosal vaccination: efficacy versus toxicity using enterotoxin based adjuvants. *Vaccine* 2002;20:2431-2438.
60. - Lodolce JP, Boone DL, Chai S, Swain RE, Dassopoulos T, Trettin S, *et al.* IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 1998;9:669-676.
61. - Moore AC, Kong W, Chakrabarti BK, Nabel GJ. Effects of antigen and genetic adjuvants on immune responses to human immunodeficiency virus DNA vaccines in mice. *Journal of Virology* 2002;76(1):243-250.
62. - Zhang R, Li M, Chen Ch, Yao Q. SHIV virus-like particles and activate human dendritic cells. *Vaccine* 2004;23(2):139-147.
63. - Jiang W, Gupta RK, Deshpande MC, Schwendeman SP. Biodegradable poly (lactic-co-glycolic acid) microparticles for injectable delivery of vaccine antigens. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005;57(3):391-410.

64. - Putnam L. Debate grows on safety of gene therapy vectors. *The Lancet* 1998;351:808.
65. - Cumming H. *Virología, Cultivo de Tejidos*. Ed. El Manual Moderno 1995:27-60.
66. - *Manual de Prácticas del Laboratorio de Virología*. Departamento de Microbiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. 1989.
67. - Alonso MRA, Castro MMC. Protocolo de preparación de células competentes DH10b. Laboratorio de Genética Molecular. UNAM-FMVZ. 2001.
68. - Schorr J, Moritz P, Schleef M. Production of plasmid DNA in industrial quantities according to GMP guidelines in: *DNA Vaccines: Methods and Protocols*. Ed by Lowrie DB and Whalen RG. Human press, New Jersey 1999: 11-21.
69. - Quiagen Plasmid Purification. Handbook 2000:8-21.
70. - Birnboim HC, Doly J. A rapid alkaline lysis procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 1979;7:1513-1522.
71. - *Prácticas de laboratorio. Bioquímica-Curso 2002*. Facultad de Ciencias. Universidad de Yucatán. 2002.
72. - VYDAC. *The handbook of analysis and purification on peptides and proteins by reversed phase HPLC*. 2^d ed. VYDAC (the separations group) 17434 Mojave Street. 1995.
73. - Mancin AC, Soares AM, Andriao-Escarso SH *et al*. The analgesin activity of crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. *Toxicon* 1998;36(12):1927-1937.

74. - HETOSICC. Manual de congelación en seco HETOSICC CD2,5. (Sin fecha de publicación).
75. - Sambrook J, Rusell DW. Calcium phosphate mediated transfection of eukaryotic cells with plasmid DNAs. In: Molecular cloning. A laboratory manual. 3rd. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001;3:16.14-16.20.
76. - SIGMA chemical company. Calcium phosphate transfection kit. Technical. 1997; Bulletin No. MB-315.
77. - Jallet C, Jacob Y, Bahloul Ch, Drings A, Desmezieres E, Tordo N, *et al.* Chimeric lyssavirus glycoprotein's with increased immunological potential. J Virol 1999;73:1, 225-233.
78. - Swartzendruber D, Lovett EJ, Hudson JL. Flow Cytometry and Monoclonal Antibodies in: Monoclonal Antibodies in Clinical Diagnostic Medicine by Gordon DS. Igaku-Shoin Medical Publishers Inc. 1st edition 1985;59-75.
79. - Bogh LD, Duling TA. Flow cytometry instrumentation in research and clinical laboratories. Clinical Laboratory Science 1993;6:3;167-173.
80. - Helater LD. Intramuscular and intradermal injection of DNA Vaccines in mice and primates, in: DNA vaccines, Methods in molecular medicine. Lowrie DB, Whalen RG. Human Press, Totowa, New Jersey 2000;71-77.
81. - BIO-RAD. Mini-Protean II. Electrophoresis Cell. Instruction Manual.
82. - BIO-RAD. Mini-Protean II. Electrotransfer Cell. Instruction Manual.
83. - Schwimmbeck PL, Lohr M, Tishon A. Viral-receptor binding assay in: Animal virus Pathogenesis. A practical Approach. Ed. By Oldstone MBA. The Practical Approach Series Editors: D. Rickwood and B. Hames 1990:137-148.

84. - Smith J, Jager P, Baer G. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining virus-neutralizing antibody, In: Laboratory Techniques in rabies 4th Ed, Ed by Meslin FX, Kaplan M, Koprowski H, World Health Organization, Geneva 1996:28-51.
85. - Nichols WW, Ledwith BJ, Manam SV, Trolie PJ. Potential DNA vaccine integration into host cell genome. *Ann NY Acad Sci* 1995;772:30-37.
86. - Thomason DB, Booth FW. Stable incorporation of a bacterial gene into adult rat skeletal muscle in vivo. *Am J Physiol* 1990;258:27(3):578-581.
87. - Ray NB, Ewalt LC, Lodmell L. Nanogram quantities of plasmid DNA encoding the rabies virus glycoprotein protects mice against lethal rabies virus infection. *Vaccine* 1997;15(8):892-895.
88. - Bahloul Ch, Jacon Y, Tordo N, Perrin P. DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. *Vaccine* 1998;16(4):417-425.
89. - Drickamer K. C-Type lectin-like domains. *Current Opinion in Structural Biology* 1999;9(5):585-590.
90. - Ferreira LAF, Mollring T, Lebrun FLAS, Raida M, Znotka R, Habermehl GG. Structure and effects of a kinin potentiating fraction F (AppF) isolated from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* venom. *Toxicon* 1995;33(10):1313-1319.
91. - Johnson EK, Kardong KV, Ownby CL. Observation on white and yellow venoms from an individual southern pacific rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*). *Toxicon* 1987;25:1169-1180.
92. - Dos Santos MC, Ferreira LCL, Dias DSW, Hurtado MFD. Caracterización de las actividades biológicas de los venenos amarillo y blanco de *Crotalus durissus*

ruruima comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. *Toxicon* 1993;31(11):1459-1469.

93. - Jilek S, Merkle HP, Walter E. DNA-loaded biodegradable microparticles as vaccine delivery systems and their interaction with dendritic cells. *Advanced Drug Delivery Reviews* 2005;57(3):377-390.

94. - Xiang ZQ, Spitalnik SL, Cheng J, Erikson J, Wojczyk B, Ertl HCJ. Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus, *Virology* 1995;209:569-579.

95. - Urabe M, Kume A, Tobita K, Ozawa K. DNA/calcium phosphate precipitates mixed with medium are stable and maintain high transfection efficiency. *Analytical Biochemistry* 2000;278:91-92.

96. - Luo D, Saltzman WM, Synthetic DNA delivery systems. *Nature Biotechnology* 2000;18(1):33-37.

97. - Batard P, Jordan M, Wurm F. Transfer of high copy number plasmid into mammalian cells by calcium phosphate transfection. *Gene* 2001;270(1-2):61-68.

98. - Jiang W, Baker H, Swango L, Schorr J, Self M, Smith B. Nucleic acid immunization protects dogs against challenge with virulent canine parvovirus. *Vaccine* 1998;16:601-607.

99. - Choi AHC, Knowlton DR, McNeal MM, Ward RL. Particle bombardment-mediated DNA vaccination with rotavirus VP6 induces high levels of serum rotavirus IgG but fails to protect mice against challenge. *Virology* 1997;232:129-138.

100. - van Drunen LHS, Braun RP, Lewis PJ, Karvonen BC, Baca EME, Snider M, *et al.* Intradermal immunization with a bovine herpesvirus-1 DNA vaccine induces protective immunity in cattle. *J General Virology* 1998;79:831-839.
101. - Hanlon CA, Murphy S, Morrill P, Niezgoda M, Lodmell D, Rupprechet CE. 2002. Rabies pre-exposure vaccination of dogs with a DNA plasmid. XIII International Meeting on research advances and rabies control in Americas 2002: 34.
102. - Tordó N, Vader E, Ewalt L, Jacob Y, Perrin P, Lodmell D. Rabies DNA vaccination: Compared efficiency of different combinations between (1) DNA plasmid; (2) G protein genes and (3) vaccine delivery methods to induce neutralizing antibodies and protects mice against challenge. 2002. Rabies pre-exposure vaccination of dogs with a DNA plasmid. XIII International Meeting on research advances and rabies control in Americas 2002:28.
103. – Tesoro CE, Hernández GR, Alonso MR, Aguilar SA. Rabies DNA vaccination by the intranasal route in dogs. *Dev. Biol. (Basel)* 2006;125:221-223.

Publicaciones derivadas del Doctorado de la MC Arcelia Alvarado Islas

1 **INTERFERENCIA DE UNA FRACCIÓN HEMAGLUTINANTE DE VENENO**
2 **CROTÁLICO EN LA ADSORCIÓN DEL VIRUS DE PARAINFLUENZA-3 (VPIB-3)**

3 Arcelia Alvarado Islas¹, Ángel Horacio Sandoval Trujillo², Octavio de Paz Villafán¹,
4 Blanca Lilia Barrón Romero³, Hernández Baumgarten Eliseo⁴, Víctor R. Tenorio
5 Gutiérrez¹, Álvaro Aguilar Setién⁵.

6 Complejos Neumónicos en Rumiantes. INIFAP-CENID-Microbiología. Km 15.5
7 Carretera México-Toluca, Palo Alto, cp 05110. México DF. Tel. 55 70 06 16, Fax
8 55 70 40 73. e-mail arce_ai@yahoo.es

9 ¹ Departamento de Epizootiología del Centro Nacional de Investigaciones
10 Disciplinarias en Microbiología (CENID-Microbiología), INIFAP-SAGARPA. Km.
11 15.5 Carretera México-Toluca, Palo Alto DF, cp 05110

12 ² División de Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma
13 Metropolitana-Xochimilco, Calzada del Hueso 1100, Edificio A, 2º piso, Col. Villa
14 Quietud, Delegación Coyoacán. México DF

15 ³ Laboratorio de Virología del Departamento de Microbiología en la Escuela
16 Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. Prolongación
17 de Carpio Esq. Plan de Ayala S/N. México DF

18 ⁴ Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Facultad de Estudios Superiores
19 Cuautitlán-UNAM. Campo 1 Dom. Conocido. Cuautitlán Izcalli Estado de México

20 ⁵ Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría del
21 Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS Av. Cuauhtémoc 300, Col. Doctores.
22 México DF, cp 03025.

23 Autor responsable: Arcelia Alvarado Islas^{*}. Km 15.5 Carretera México-Toluca, Palo
24 Alto, cp 05110. México DF. Tel 55 70 06 16, Fax 55 70 40 73 arce_ai@yahoo.es

25 Proyecto Z0006B financiado por CONACYT, bajo la responsabilidad del Dr. Álvaro
26 Aguilar Setién y Proyecto 4212941P financiado por INIFAP-SAGARPA, bajo la
27 responsabilidad del primer autor.

28 Recibido el 6 de Septiembre de 2005.

* El trabajo presentado es el resultado de una tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco (UAM-X).

1 **Resumen**

2 Se evaluó una fracción proteínica con actividad hemaglutinante (fracción AL27),
3 aislada del veneno de la serpiente *Agkistrodon piscivorus*, en su aptitud para
4 inhibir "in vitro" al virus de Parainfluenza-3 Bovino (VPIB-3), ya sea por su
5 capacidad de bloquear receptores celulares, o por su adherencia a las espículas
6 de la hemaglutinina viral. La adición de $\leq 1.062 \mu\text{g/mL}$ de AL27 en cultivos MDBK
7 previa a la infección con el VPIB-3 (título $10^{5.6}\text{DICC}_{50\%}$), impidió el daño o
8 destrucción de los tejidos, manteniendo la viabilidad celular entre el 69.43 y
9 84.86%. Por otro lado, tras la mezcla de ambos reactantes en proporción 1:1 (1
10 mL AL27 en concentración $\leq 1.062 \mu\text{g/mL}$ + 1 mL VPIB-3 con título $10^{5.6}\text{DICC}_{50\%}$) e
11 incubación a 37°C por 1 h, se detectó al microscopio electrónico una aparente
12 unión de AL27 con las espículas de hemaglutinina virales. El bloqueo del VPIB-3
13 por AL27 se dedujo por la reducción del título viral de $10^{5.6}$ a $10^{2.0}\text{DICC}_{50\%}$.
14 Además, se detectó una probable identidad entre AL27 y VPIB-3, por el
15 reconocimiento de una proteína común de 21 kDa al realizar un Western blot con
16 suero hiperinmune anti-*Agkistrodon piscivorus*. Los resultados muestran la
17 factibilidad de que la fracción AL27 pueda ser empleada como agente antiviral.

18

19 **Palabras clave:** VENENO CROTÁLICO, FRACCIONES HEMAGLUTINANTES,
20 LECTINAS, ANTIVIRALES, VIRUS DE PARAINFLUENZA-3 BOVINO (VPIB-3)

21

1 INTERFERENCIA DE UNA FRACCIÓN HEMAGLUTINANTE DE VENENO
2 CROTÁLICO EN LA ADSORCIÓN DEL VIRUS DE PARAINFLUENZA-3 (VPIB-3)

3 Arcelia Alvarado Islas¹, Ángel Horacio Sandoval Trujillo², Octavio de Paz Villafán¹,
4 Blanca Lilia Barrón Romero³, Hernández Baumgarten Eliseo⁴, Víctor R. Tenorio
5 Gutiérrez¹, Álvaro Aguilar Setién⁵.

6 **Abstract**

7 An isolated fraction of venom of *Agkistrodon piscivorus* with hemagglutinant
8 property was evaluated in its capacity to inhibit the adherence to the Bovine
9 Parainfluenza-3 (PI3) virus, either for its capacity to block cell receptors or its
10 adherence to the hemagglutinin viral receptors. Fraction AL27 acting as a receptor
11 block, at a concentration $\leq 1.062 \mu\text{g/mL}$, avoided any damage or destruction of
12 MDBK cell cultures by the virus PI3 (Titer $10^{5.6}\text{TCID}_{50\%}$), maintaining a cell viability
13 between 69.43 and 84.86 %. The adherence capacity of AL27 to the hemagglutinin
14 viral receptors of PI3 virus was determined incubating both reactants 1:1 (1 mL
15 AL27 at concentration $\leq 1.062 \mu\text{g/mL}$ + 1 mL VPIB-3 titer $10^{5.6}\text{DICC}_{50\%}$) at 37°C for
16 1 hour, detecting in an electron microscope a provable adherence to the viral
17 hemagglutinin receptors. The inactivation of PI3 virus by AL27 was deduced by the
18 reduction of the viral titer from $10^{5.6}$ to $10^{2.0} \text{TCID}_{50\%}$. The apparent identity
19 between AL27 and PI3 virus was determined by recognition of the common protein
20 of 21 kDa when performing a Western Blot using hyper-immune anti-*Agkistrodon*
21 *piscivorus* serum. This outcome shows the possibility to use AL27 fraction as
22 antiviral agent.

23

1 **Key Words:**

2 **CROTALID VENOM, HEMAGGUTINANT FRACTION, LECTINS, ANTIVIRAL,**

3 **BOVINE PARAINFLUENZA-3 (PI-3) VIRUS.**

4

1 **Introducción**

2 El control del virus de Parainfluenza-3 Bovino (VPIB-3) se limita a la
3 inmunoprofilaxis, sin embargo, podría ser ampliado a la quimioprofilaxis o
4 quimioterapia. Existen fármacos antivirales como la amantadina^{*}, rimantadina[†] y
5 zanamivir, utilizadas para el control del virus de Influenza A humana (agente con
6 una gran semejanza en la presentación de signos y la función de algunas
7 proteínas estructurales al VPIB-3) (1). Las dos primeras sustancias interfieren en
8 el ciclo de la replicación viral, evitando los cambios en el pH que requiere el virión
9 para verter su contenido en el citosol, mientras que el zanamivir bloquea el sitio
10 activo de la neuraminidasa e interrumpe el recorte del ácido siálico y,
11 consecuentemente inhibe la liberación y difusión de los viriones (2). A nivel
12 experimental, se ha evaluado una lectina aislada de semillas de diversas plantas
13 (Concavalina A) como agente antiviral, la cual ha mostrado la capacidad de
14 capturar a la proteína gp120 y reducir el título del virus de inmunodeficiencia
15 humana (HIV-1) (3). Retomando la analogía de evadir la infección por interrupción
16 del ciclo de replicación, en el presente trabajo se pretende evitar *in vitro* la
17 infección del VPIB-3, interfiriendo en el mecanismo de adsorción del virus a la
18 célula, mediante el uso de una lectina hemaglutinante de origen crotálico
19 denominada AL27, la cual, en estudio previo, resultó inocua tanto *in vitro* como *in*
20 *vivo* (4). Las hemaglutininas o lectinas se caracterizan por actuar como inductores
21 de la aglutinación de plaquetas, al poseer sitios de unión con receptores ácido
22 siálico de la membrana celular, y mediante este mecanismo pueden traspasar la

* Symadine

† Flumadine

1 membrana (5). Estas hemaglutininas se encuentran en gran abundancia en el
2 veneno de serpiente de los géneros *Agkistrodon* y *Crotalus*, entre otros (6,7). Las
3 espículas de hemaglutinina de los virus de Influenza A y VPIB-3 son reconocidas
4 por los receptores ácido siálico de las células huésped (1), por lo que es factible
5 que las hemaglutininas de los venenos crotálicos puedan ser reconocidas por los
6 mismos receptores y actúen como agentes bloqueadores o competidores que
7 permitan evitar la infección. Por otro lado, las hemaglutininas crotálicas podrían
8 inhibir o capturar a las virales, dada la afinidad de las hemaglutininas crotálicas
9 con los residuos de carbohidratos ubicados en el sitio de unión de la espícula viral
10 (8).

11

1 **Material y Métodos**

2 ***Cultivo de Tejidos***

3 Se emplearon monoestratos celulares de la línea MDBK (Madin Darby Bovine
4 Kidney) y se sembraron en botellas con área de cultivo de 175 cm² ^{*} o
5 microplacas de poliestireno estériles de fondo plano, de 96 pozos[†], a una
6 concentración de 2 X 10⁵ células/mL en medio de cultivo MEM (Medio Mínimo
7 Esencial EAGLE)[‡], complementado con 10% de suero fetal bovino inactivado[§] y
8 mezcla penicilina-estreptomicina de 10 000 UI/μg/mL^{**}.

9 ***Cepa Viral***

10 El virus de Parainfluenza-3 Bovino (VPIB-3) se replicó por inoculación con 1 mL de
11 la cepa IMSS, título de 10^{5.6}DICC_{50%} (Dosis Infectantes en Cultivos Celulares 50%)
12 en cultivos MDBK 100% confluentes, con incubación a 37°C por 1 h. Tras
13 desechar el inóculo y reemplazarlo por medio MEM estéril, se continuó la
14 incubación por 24 h más, tiempo en el cual se obtuvo el 80% de efecto citopático.
15 Las células infectadas se sometieron a 3 ciclos de congelación y descongelación
16 para liberar a las partículas intracelulares y clarificación por centrifugación a 3500
17 g por 10 min en centrífuga refrigerada^{††}. La suspensión viral obtenida fue
18 concentrada por centrifugación a 10000 g, por 1 h, en centrífuga refrigerada^{††}. El
19 botón se resuspendió en solución salina estéril (NaCl 0.15 M, pH de 7.2) y se
congeló hasta su uso a -70°C.

^{*} Nunc No. Cat.184502

[†] Nunc, No. Cat. 167008

[‡] In Vitro, No. Cat. ME-055

[§] Sigma, No. Cat. F2442

^{**} In Vitro No. Cat. A-01

^{††} Beckman TJ-6

^{†††} MSE, High Speed 18

1 **Veneno Crotálico**

2 El veneno liofilizado de *Agkistrodon piscivorus*, se reconstituyó a una proporción
3 de 10 mg/mL de H₂O grado HPLC[†], filtrándose con membrana de nylon de 0.22
4 μm de porosidad[‡].

5 **Suero Hiperinmune anti-*Agkistrodon piscivorus***

6 Se inocularon 2 conejos con una dosis de 1.75 mg/30 g de peso corporal (4) del
7 veneno de *A. piscivorus*, diluido en 0.5 mL de solución salina estéril y adicionado
8 en una proporción 1:1 con adyuvante completo de Freund, aplicando 2 estímulos a
9 intervalo de 7 días; un tercero con incremento de la dosis a 2.0 mg y dos estímulos
10 más en dosis de 4.0 mg/30 g de peso corporal, a intervalo de 14 días. Se recolectó
11 el suero de ambos animales a intervalos de 7 días, iniciando en la aplicación del
12 segundo estímulo y hasta los 28 días posteriores a la última inoculación.

13 Se determinó la respuesta inmune por inhibición de la hemoaglutinación en placa
14 (9). El veneno de *A. piscivorus* se reconstituyó a la proporción de 6.25 mg/mL con
15 solución reguladora de Tyrodes (Glucosa 5 mM, NaCl 0.15 M, NaH₂PO₄ H₂O 0.36
16 mM, NaHCO₃ 20 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, KCl 2 mM, pH de 7.4). En
17 microplacas de fondo en "V"[‡] se depositaron 50 μl/pozo de solución salina. En el
18 primer pozo de cada línea se adicionaron 50 μl de suero anti-*A. piscivorus*,
19 realizando diluciones dobles desde 1:2 hasta 1:256. Posteriormente se agregaron
20 50 μL/pozo de veneno de *A. piscivorus* reconstituido, además de 50 μL de glóbulos
21 rojos de conejo al 2.5%. Se incubaron las placas por 20 min a medio ambiente y la
22 lectura fue por apreciación de la inhibición de la hemaglutinación.

[†] Sigma. No. Cat. 27.073-3

[‡] Millipore, No. Cat. GSWP 047 00

[‡] Nunc. No. Cat. M 2686

1 ***Extracción de Membrana Celular***

2 Se desarrollaron monoestratos MDBK al 100% de confluencia en botellas de
3 poliestireno y se lavaron con PBS estéril (NaCl 0.14 M, KCl 4 mM, NaHPO₄·2H₂O
4 19 mM, KH₂PO₄ 2 mM, pH 7.4). Las células se desprendieron por raspado, se
5 disgregaron a presión a través de una jeringa con aguja de 20 X 38 mm y
6 posteriormente se resuspendieron en PBS a una concentración celular de 1 X
7 10⁸/mL. El paquete celular se lavó mediante cambios de PBS y centrifugación a
8 3500 g por 10 min en 3 ocasiones. La ruptura celular se llevó a cabo mediante 9
9 ciclos de 15 seg de sonicación*, a una frecuencia de 15 micrones de amplitud. La
10 suspensión fue centrifugada a 14000 g/1h en centrífuga refrigerada, desechando
11 el sobrenadante con los detritos celulares, mientras que el botón (membrana
12 celular) se resuspendió en 300 µL de PBS (10). La cuantificación de la proteína se
13 hizo por microtitulación de Bradford (11).

14 ***Titulación***

15 La titulación del virus y fluidos virales se realizó por conteo de placas líticas (12),
16 en cultivos de células MDBK, 100% confluentes (placas de plástico de 96 pozos,
17 estériles), inoculados con diluciones logarítmicas del VPIB-3 (de 10⁻¹ a 10⁻⁸) e
18 incubando 48 h a 37°C. La lectura fue por apreciación del efecto citopático en un
19 microscopio invertido†, con objetivo 10X y ocular 8X, y el cálculo del título viral fue
20 por el método de Reed y Muench (13).

21 ***Aislamiento de Fracción Crotálica AL27***

* Sonicador Ultrasonic Processor

† Zeizz

1 Se empleó el proceso de cromatografía líquida de alto rendimiento, en fase
2 reversa (HPLC-RP), con una columna de gel de sílice C₁₈^{*} y un inyector de 50 µL.
3 El veneno reconstituido de *A piscivorus* fue solubilizado con ácido trifluoroacético
4 (TFA)[†] al 0.1% en H₂O grado HPLC (disolvente A), y acetonitrilo[‡] con TFA al 0.1%
5 (disolvente B). El gradiente de elusión inicial fue de 30% del disolvente B sobre el
6 A, hasta alcanzar 100% del B, a un tiempo de 10 min, con flujo de 1mL/min. La
7 absorbancia se midió a una longitud de onda de 280 nm (4, 14, 15). La selección
8 de la fracción AL27 tras el proceso cromatográfico fue por detección de su
9 actividad mediante pruebas de hemaglutinación (6), siendo ésta de un título de 64
10 UH (Unidades hemaglutinantes).

11 **Bloqueo de Receptores Celulares**

12 Se empleó la prueba de reducción del tetrazolium (MTT) para evaluar la viabilidad
13 celular posterior al proceso de infección (16, 17). En cultivos confluentes de
14 células MDBK, desarrollados en microplaca de poliestireno de 96 pozos, se
15 depositaron 50 µL/pozo de la fracción AL27 en la concentración previamente
16 determinada como inocua para la viabilidad celular de 1.062 µg/mL (4). Después
17 de 1 h de incubación a 37°C con la fracción AL27, los monoestratos se lavaron
18 con PBS y se inocularon con el virus VPIB-3 en dosis de 10^{5.6}, 10^{4.6}, 10^{3.6} y 10^{2.6}
19 DICC_{50%}, contenidos en volúmenes de 50 µL/pozo. Como testigos se emplearon
20 medio de cultivo MEM estéril, virus VPIB-3 en dosis de 10^{2.6} DICC_{50%} libre de
21 AL27, así como la fracción AL27 en concentración previamente determinada como

* 5µL, 4.6 X 2.50 mm

† Sigma, No. Cat. 09653

‡ Sigma, No. Cat. 27071-7

1 capaz de alterar la viabilidad celular de 4.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (4), libre de VPIB-3. Los
2 monoestratos se incubaron durante 48 h a 37°C.

3 Se adicionó en toda la placa 100 μg de MTT/pozo (3-[4, 5-Dimethyl-thiazol-2-Yl]-2,
4 5-diphenyltetrazolium bromide)* y se incubó a 37°C por 4 h. Posteriormente se
5 adicionó 50 μL /pozo de SDS (15% w/v Dodecil sulfato de sodio, HCl 0.02 M) e
6 incubó durante toda la noche a temperatura ambiente en cámara oscura. Se midió
7 la absorbancia a una longitud de onda de 492 nm en un lector de ELISA† y la
8 interpretación se hizo por análisis de varianza (18).

9 ***Bloqueo de Hemaglutinina Viral***

10 Dos mililitros de suspensión del virus VPIB-3 con un título viral de $10^{5.6}$ DICC_{50%}
11 fueron clarificados por centrifugación a 3500 g por 10 min. La suspensión viral se
12 dividió en dos partes iguales, la primera se mezcló en proporción 1:1 con la
13 fracción AL27 previamente diluida a una concentración de 1.062 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (VPIB-
14 3/AL27) e incubó durante 1 h a 37°C y la segunda (VPIB-3) se mantuvo en
15 refrigeración hasta su uso. El VPIB-3 y la mezcla VPIB-3/AL27 se centrifugaron a
16 15000 g por 30 min, en centrífuga refrigerada. Los botones obtenidos se fijaron
17 con glutaraldehído‡ al 10% en PBS estéril y para la tinción negativa se empleó
18 ácido fosfotúnstico§ al 2% en H₂O. La observación al microscopio electrónico fue a
19 50000 aumentos (19).

20 El fluido que se cosechó después de la última centrifugación de la mezcla VPIB-
21 3/AL27, se tituló por la técnica de conteo de placas líticas descrita previamente,

* Sigma, No. Cat. M-5855

† BDSL. Immunoskan Plus

‡ Sigma, No. Cat. G5882

§ Sigma, No. Cat. P4006

1 empleando diluciones logarítmicas de los fluidos desde 10^{-1} a 10^{-8} . Como testigo
2 se empleó el virus de VPIB-3 ($10^{5.6}$ DICC_{50%}) (12).

3 ***Afinidad entre el VPIB-3 y la Fracción Crotálica AL27***

4 Se realizaron corrimientos electroforéticos en condiciones desnaturalizantes en
5 geles de poliacrilamida al 12% (3.5 mL de H₂O destilada, 2.5 mL de Tris-HCl 1.5 M
6 y pH 8.8, SDS 0.35 M, 4 mL de acrilamida/bisacrilamida al 30%, persulfato de
7 amonio 0.4 M y 5 μ L de TEMED) con suspensión del VPIB-3 en dosis de $10^{3.6}$,
8 $10^{4.6}$ y $10^{5.6}$ DICC_{50%}, extractos de membrana de células MDBK en concentración
9 de 5 y 10 μ g, un marcador de pesos moleculares de 201 a 6.6 kDa^{*} como testigo,
10 la fracción AL27 a una concentración de 2.125 y 4.25 μ g/mL, y el veneno de *A*
11 *piscivorus* a una concentración de 1.56 mg/mL. El corrimiento se realizó a 15 y 50
12 mA por 10 y 45 min, respectivamente. Se tiñeron con azul de Coomassie al 1%[†]
13 por 1 h y se decoloraron con ácido acético al 5%[‡] por 24 h (10, 20, 21). Los pesos
14 moleculares se determinaron por regresión lineal, mediante un analizador de
15 imágenes, con el programa Quantity One[§]. Las proteínas separadas se
16 transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.2 μ m de porosidad^{**}, con
17 corrimiento a 100 V, por 1 h (10, 22). Se realizó la prueba de Western blot en las
18 membranas transferidas utilizando el suero hiperinmune de *A piscivorus* (1:40). El
19 revelado se realizó utilizando un anticuerpo anti-IgG anti-conejo biotinilado
20 (1:2000) y se conjugaron con avidin-peroxidasa (1:6000). Se utilizó como

* Bio Rad No. Cat. 161-0318

† Sigma No. Cat. B8522

‡ Sigma No. Cat. 28202-2

§ Bio-Rad

** Bio-Rad No. Cat. 1703932

1 cromógeno diaminobenzidina (25 mg de diaminobenzidina, 50 mL de PBS y H₂O₂
2 8.8 M) incubando por 10 min a 37°C en agitación (10).

3 **Resultados**

4 ***Bloqueo de Receptores Celulares***

5 En las pruebas de reducción del tetrazolium (MTT) empleadas para evaluar la
6 capacidad de bloquear o inhibir la unión del VPIB-3 a los receptores celulares, la
7 medición de la viabilidad celular en el control positivo de VPIB-3 en dosis de 10^{2.6}
8 DICC_{50%}, fue de un porcentaje de 68.78%, mientras que para el testigo positivo de
9 la fracción AL27 en concentración previamente determinada como dañina para la
10 viabilidad celular de 4.25 µg/mL fue de 58.69%. Los porcentajes de viabilidad en el
11 bloqueo viral, con la fracción AL27 en una concentración constante de 1.062
12 µg/mL y el virus en dosis de 10^{5.6}, 10^{4.6}, 10^{3.6} y 10^{2.6} DICC_{50%} fueron de 69.34,
13 72.71, 80.93 y 84.86%, respectivamente. Al análisis estadístico, la varianza dio
14 valores de 0.0126, 0.0123, 0.0072 y 0.0055 para las dosis de 10^{5.6} a 10^{2.6},
15 respectivamente.

16 ***Bloqueo de Hemaglutinina Viral***

17 En las pruebas de microscopía electrónica, realizadas para determinar si AL27
18 pudiese reconocer los carbohidratos presentes en las hemaglutininas virales, se
19 observó que la pastilla colectada tras la centrifugación de la mezcla VPIB-3/AL27
20 contenía grumos de virus en los que se distinguían numerosas partículas con la
21 morfología característica (Figuras 1A y 1B) (aumento 50000X), en tanto que los
22 virus que se encontraron en la pastilla del virus solo (sin AL27) no permitió ver
23 virus con morfología característica.

1 El título viral del VPIB-3 posterior a su incubación con la fracción AL27 aislada de
2 *A piscivorus* se redujo de $10^{5.6}$ DICC_{50%} a $10^{2.0}$ DICC_{50%}.

3 **Afinidad entre el VPIB-3 y la Fracción Crotálica AL27**

4 El suero hiperinmune contra *A piscivorus* mostró capacidad de inhibir la
5 hemaglutinación producida por el veneno hasta la dilución de 1:64
6 (correspondiente a 64 unidades inhibitorias de la hemaglutinación, UIH).

7 Al analizar el veneno de *A piscivorus* (con todos sus componentes proteínicos y
8 polipeptídicos), en la electroforesis de proteínas estructurales (Figura 2) se detectó
9 la presencia de 8 bandas de proteína, de aproximadamente 93, 59, 46, 42, 36, 33,
10 26 y 21 kDa (Línea 1). La fracción crotálica AL27 mostró tener un peso molecular
11 de 21 kDa (Líneas 2 y 3). Es probable que la presencia de dos bandas extras de
12 38 y 28 kDa en la línea 3, se deba a la alta concentración de AL27 no
13 desnaturalizada en conformación dimérica o trimérica. En las pruebas de Western
14 blot (Figura 3), el suero hiperinmune de conejo anti-*A piscivorus* marcó una fuerte
15 tinción en las bandas proteínicas correspondientes a los 21 kDa en el veneno de *A*
16 *piscivorus* y en la fracción crotálica AL27 en concentración de 4.25 y 2.125 $\mu\text{g/mL}$
17 (Líneas 9, 8 y 7). También se encontró el reconocimiento de otras bandas, las
18 cuales pueden corresponder a polímeros de la proteína de 21 kDa. Bajo una débil
19 tinción, aparentemente el VPIB-3 en concentración de $10^{4.6}$ y $10^{5.6}$ DICC_{50%}
20 (Líneas 2 y 3) muestra una proteína de peso molecular similar (21 kDa). Esta no
21 se aprecia en la dosis de $10^{3.6}$ DICC_{50%} del VPIB-3, ni en los extractos de
22 membrana celular (Líneas 1, 4 y 5). El suero hiperinmune también detectó ciertas

- 1 bandas de identidad entre el VPIB-3 y los extractos de membrana de las células
- 2 en que éste fue replicado.

1 **Discusión**

2 Se demostró que es factible emplear a la fracción hemaglutinante del veneno
3 crotálico (AL27) como agente antiviral, al poseer la dualidad de acción en la
4 inhibición de la adherencia viral, al bloquear a los receptores ácido siálico
5 celulares y unirse a los carbohidratos de la hemaglutinina viral. Durante la
6 evaluación del bloqueo viral, a través de la adherencia de AL27 hacia los
7 receptores ácido siálico celulares, la viabilidad detectada por la inoculación de las
8 MDBK por VPIB-3/AL27, fue superior al testigo de cada uno de ellos en forma
9 individual (68.78 y 58.69%, respectivamente), y aunque no alcanzó el nivel de las
10 células testigo (100%), los porcentajes de viabilidad celular fueron mejores con
11 valores de 69.34, 72.71, 80.93 y 84.86%, y las diferencias estadísticas (0.0126,
12 0.0123, 0.0072 y 0.0055) no fueron significativas. Básicamente, no existe un
13 trabajo previo con hemaglutininas (lectinas) sobre el cual se pudiese establecer un
14 patrón comparativo de los resultados obtenidos. Se esperaba que durante el
15 bloqueo, al emplear ambos agentes a las concentraciones previamente
16 establecidas como no dañinas, la viabilidad se mantendría en su máximo nivel. El
17 menor índice de óxido-reducción de las células, se debió a la combinación de
18 ambos reactantes, aunque sin llegar a causar apoptosis (por efecto de AL27) (23)
19 o lisis celular (por efecto viral) (1). Aparentemente, las secuencias N-terminales
20 de la hemaglutinina crotálica (24) mostraron una mayor afinidad hacia los
21 carbohidratos de las hemaglutininas del VPIB-3, que por los receptores ácido
22 siálico de las células MDBK. Lo anterior se observó en las pruebas de evasión de
23 la infección viral, por la aparente unión de AL27 a las espículas del VPIB-3. Las
24 Figuras 1A y 1B muestran una superficie con unidades virales cubiertas con AL27.

1 La técnica empleada no permitió distinguir el sitio de acción de la lectina crotálica.
2 Las micrografías electrónicas sugieren que el sitio de acción pudiera ser la
3 glicoproteína viral. El hecho de que no se encuentren todos los peplómeros
4 cubiertos con la fracción crotálica AL27 sugiere que la unión es débil y reversible
5 con tendencia a desintegrarse durante la preparación para observarla al
6 microscopio electrónico. Lo anterior, también explicaría que aún en la abundancia
7 de moléculas de AL27 presentes en la reacción, el virus continúe su replicación a
8 una baja tasa y no deje de multiplicarse en las células por completo. Otro factor
9 que mostró la posible afinidad de AL27 hacia la hemaglutinina viral fue la titulación
10 de la cepa del VPIB-3, la cual, tras su previa incubación con la fracción AL27 de *A*
11 *piscivorus*, redujo su actividad drásticamente de $10^{5.6}$ DICC_{50%} a $10^{2.0}$ DICC_{50%}.
12 Este tipo de unión o reconocimiento entre fragmentos virales con agentes
13 hemaglutinantes se ha realizado previamente. Hayakawa *et al* (3) demostraron
14 que la proteína gp120 del virus de inmunodeficiencia humana-1 (HIV-1)
15 interactuaba fuertemente con algunas lectinas o hemaglutininas, particularmente la
16 Conavalina A (Con A), que redujo el nivel de gp120 y el índice de infectividad del
17 HIV-1, tras la incubación de ambos reactantes a temperatura ambiente. Las
18 similitudes entre las proteínas estructurales virales y las hemaglutininas crotálicas
19 se determinaron por la comparación de sus pesos moleculares y reconocimiento
20 por anticuerpos específicos anti-*A piscivorus* mediante "Western blot".
21 Francischetti *et al.* (24), al aislar una proteína con actividad de lectina, del veneno
22 de la serpiente *Crotalus durissus*, a la que denominó "convulxina", la registra como
23 una proteína única de 72 kDa, que al ser sometida a condiciones reductoras se
24 divide en dos polipéptidos de peso molecular de 13.5 y 12.5 kDa. Hirabayashi *et*

1 *al.* (25), al aislar la lectina del veneno de *Crotalus atrox*, informó de la presencia de
2 una sola hemoaglutinina con peso molecular de 14.4 kDa en condiciones
3 reductoras y de 31.0 kDa en condiciones no reductoras. Ogilvie *et al.* (26), al aislar
4 las lectinas del veneno de *Lachesis muta* y *Dendroaspis jamesonii* informaron que
5 ambas poseían pesos moleculares de 14 kDa en condiciones reductoras, y 28 kDa
6 en condiciones no reductoras. Si bien los pesos moleculares informados por estos
7 autores no son idénticos a los del presente trabajo, sí se aproximan con lo
8 encontrado en los diversos corrimientos electroforéticos de la fracción AL27 de *A*
9 *piscivorus* en condiciones reductoras, en los que el peso molecular fue de 21 kDa.
10 Por otro lado, en las pruebas de identidad de las hemaglutininas crotálicas y
11 proteínas estructurales virales, se observó en ambos reactantes, bandas de 21
12 kDa que reaccionaron con los anticuerpos anti-*A piscivorus*, con una mayor
13 afinidad hacia las correspondientes a AL27. Sin embargo, el reconocimiento hacia
14 la proteína viral también fue claro cuando el antígeno se encontró a una alta
15 concentración.

16 Por los resultados obtenidos en el presente trabajo, se concluye que la actividad
17 antiviral a través del bloqueo de los receptores celulares es satisfactoria.

18 A pesar de que no se obtuvo la eficiencia esperada (100% de viabilidad celular),
19 se logró mantener los monoestratos celulares en porcentajes de viabilidad
20 aceptables, sin dar cabida al efecto lítico viral, ni favorecer la apoptosis celular.

21 Por otra parte, se observó que también existe actividad antiviral dada por una
22 aparente afinidad de AL27 hacia los carbohidratos presentes en la hemaglutinina
23 viral, ya que ésta logró reducir el título viral del VPIB-3. Lo anterior induce a
24 considerar la factibilidad de emplear a AL27 como agente antiviral, sin embargo,

- 1 aún es necesario realizar un mayor número de estudios *in vitro* para finalmente
- 2 evaluar su efectividad *in vivo*.

1 **Agradecimientos**

2 Los autores agradecen a la M en C Sofia González G y a la QFB Rosario Ruiz V
3 su ayuda en la microscopía electrónica de este trabajo.

4 Los autores agradecen a la Dra. Mónica Salmerón del Herpetario de la Facultad
5 de Ciencias de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) la donación
6 del veneno crotálico liofilizado de la serpiente *Agkistrodon piscivorus*.

1 **Referencias**

- 2 1.-Collins PL, Chanok RM. McIntosh: Parainfluenza viruses. In: Fields DM. Knipe
3 PM. Howley *et al.* editors. Fields Virology. Philadelphia: Lippincott-Raven
4 Publishers, 1996:1177-1204.
- 5 2.- Graeme LW, Bischofberger N, Webster RG. Disarming flu viruses. Sci Am
6 1999:56-65.
- 7 3.- Hayakawa T, Nikawa T, Kishida A, Akashi M, Baba M. Capture of HIV-1 gp120
8 and virions by lectin-immobilized polystyrene nanospheres: Potential approach
9 toward prevention of HIV-1 infection. Antiviral Res 1995; 27(1-2):49-57.
- 10 4.- Alvarado IA, De Paz VO, Campos LY, Ramos RL, Aguilar SA. Aislamiento de
11 una Fracción Crotálica con Actividad Hemoaglutinante y Evaluación *In Vivo* e *In*
12 *Vitro* del Probable Daño a Tejidos. Tec Pecu Mex 2003;42(2):247-260.
- 13 5.- Manjunatha RK, Evans HJ. Effects of Snake Venom Proteins on Blood
14 Platelets. Toxicon 1990;8(12):1387-1422.
- 15 6.- Ogilvie ML, Gartner TK. Identification of lectins in snake venoms. J Herpetol
16 1984;(18):285-290.
- 17 7.- Gartner TK, Ogilvie ML. Isolation and characterization of three Ca⁺⁺ dependent
18 β -galactoside-specific lectins from snake venoms. Biochem J 1984;(224):301-307.
- 19 8.- Sharon N, Lis H. Lectins: cell-agglutinating and sugar specific proteins. Science
20 1972;(177):949-959.
- 21 9.- Barret T, Inglis SC. Virology, a practical approach In: Mahy BWJ editors.
22 Practical approach series. Oxford Washington DC: IRL press, 1991:119-150.

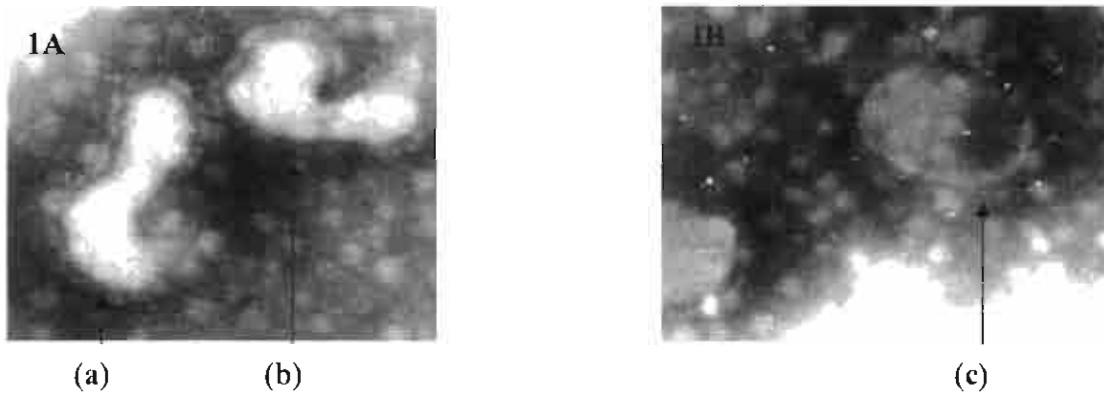
- 1 10.- Schwimmbeck PL, Lohr M, Tishon A. Viral-receptor binding assay In: D.
2 Rickwood and B. Hames editors. Animal virus Pathogenesis. A practical Approach.
3 Oxford; IRL University press, 1990:137-148.
- 4 11.- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms
5 quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. Annal Biochem
6 1976;(72):248-254.
- 7 12.- Jenney EW, Wessman SJ, Spinka FL. Microtitration serology methods for
8 bovine virology. Ames Iowa; US department of Agriculture. Animal and Plant Health
9 Inspection Service 1978.
- 10 13.- OMS. La Rabia. Técnicas de laboratorio. 3^a ed Ginebra Suiza; Organización
11 mundial de la salud, 1975:348.
- 12 14.- VYDAC. The handbook of analysis and purification on peptides and proteins
13 by reversed phase HPLC. 2nd ed. VYDAC (the separations group) 17434 Mojave
14 Street. Hesperia CA 92345 USA, 1995.
- 15 15.- Mancin AC, Soares AM, Andriao-Escarso SH. *et al.* The analgesin activity of
16 crotamine, a neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* (south American
17 rattlesnake) venom: a biochemical and pharmacological study. Toxicon
18 1998;36(12):1927-1937.
- 19 16.- Hayes PJ, Scoot R, Wheeler J. *In vivo* production of tumor necrosis factor- α
20 and interleukin-6 in Balb/c mice inoculated intranasally with a high dose of
21 respiratory syncytial virus. J Med Virol 1994;(42):323-329.

- 1 17.- Martikainen P, Nyman K, Nevalainen TJ. Toxic effects of human pancreatic
2 and snake and bee venom phospholipases A₂ on MCF-7 cells in culture. *Toxicon*
3 1993;31(7):835-843.
- 4 18.- Wayne WD. *Bioestadística*. 3^a ed. México DF; Editorial Limusa, 1989.
- 5 19.- Dawes CJ. *Biological techniques in electron microscopy*. Barnes and Noble
6 International Textbook Series. 1973;17(46):131-150.
- 7 20.- BIO-RAD. Mini-Protean II. Electrophoresis Cell. Instruction Manual. 2000
8 Alfred Novel Drive Hercules, California, USA. Life Science group. Sin fecha de
9 publicación.
- 10 21.- Instituto Politécnico Nacional. *Manual de Prácticas de Laboratorio de*
11 *Virología*. Departamento de Microbiología. Instituto Nacional de Ciencias
12 *Biológicas*. Instituto Politécnico Nacional ISBN 968-28-2449-9, 1989:62-77.
- 13 22.- BIO-RAD. Mini-Protean II. Electrotransfer Cell. Instruction Manual. 2000 Alfred
14 Novel Drive Hercules, California, USA. Life Science group. Sin fecha de
15 publicación.
- 16 23.- Cotter TG, Lennon SV, Glynn JG, Martin SJ. Cell death via apoptosis and its
17 relationship to grow, development and differentiation of both tumour and normal
18 cells. *Anticancer Res* 1990;10(5A):1153-1159.
- 19 24.- Francischetti IMB, Saliou B, Leduc M, Carlini CR, Hatmi M, Randon J, *et al.*
20 *Convulxin*, a potent platelet-aggregating protein from *Crotalus durissus terrificus*
21 *venom*, specifically binds to platelets. *Toxicon* 1997;35(8):1217-1228.
- 22 25.- Hirabayashi J, Kusunoki T, Ken-ichi K. Complete Primary Structure of a
23 Galactose-specific Lectin from the Venom of the Rattlesnake *Crotalus atrox*. *J Biol*
24 *Chem* 1991;286(4):2320-2326.

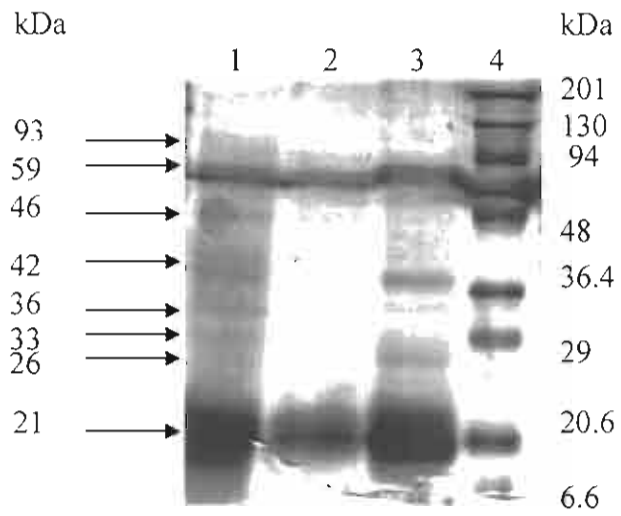
- 1 26.- Ogilvie ML, Dockter ME, Wenz L, Gartner TK. Isolation and Characterization
- 2 of Lactose-Binding Lectins from the venoms of the Snake *Lachesis muta* and
- 3 *Dendroaspis jamesonni*. J Biochem 1986;(100):1425-1431.

4

5



1
2
3 **FIGURA 1.-** Microscopía electrónica de partículas virales del VPIB-3 con la
4 fracción crotálica AL27 (aumento 50000X). En la figura 1A la partícula (a) muestra
5 los peplómeros virales adheridos a la membrana y hay cinco partículas globulares
6 superpuestas a los peplómeros que podrían ser AL27. La partícula (b) también
7 muestra los peplómeros virales pero sin partículas globulares adheridas. En la
8 figura 1B se observan varias partículas virales pleomórficas y esféricas. Las
9 partículas esféricas parecen estar rotas y una de ellas está parcialmente
10 penetrada por el ácido fosfotúngstico (c).



1
2
3
4
5
6
7
8
9

10 **FIGURA 2.-** Electroforesis en condiciones desnaturizantes del veneno de *A*
11 *piscivorus* y de la fracción crotálica AL27. Línea 1, veneno de la serpiente
12 *Agkistrodón piscivorus*; línea, 2 fracción AL27 por HPLC-RP (2.125 µg/mL); línea
13 3, fracción AL27 por HPLC-RP (4.25 µg/mL); línea 4, marcador de peso molecular.

14
15
16
17
18
19
20
21
22
23

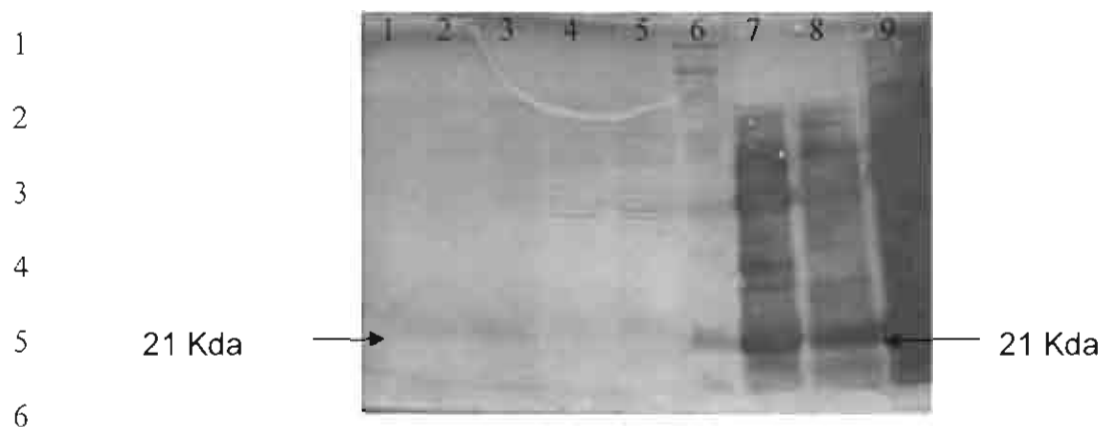


FIGURA 3.- "Western blot" marcando una aparente identidad entre la hemaglutinina crotálica AL27 y una proteína estructural del VPIB-3. Línea 1, 2 y 3 Proteínas de VPIB-3 a $10^{3.6}$, $10^{4.6}$ y $10^{5.6}$ respectivamente; línea 4 y 5 células MDBK a 5 y 10 μg respectivamente; línea 6, marcadores de peso molecular; líneas 7 y 8, fracción AL27 a 2.125 y 4.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente; línea 9, Veneno de *A. piscivorus*.

El jurado designado por las Divisiones de Ciencias Biológicas y de la Salud

De las Unidades Iztapalapa y Xochimilco

Aprobó la tesis que presentó

Arcelia Alvarado Islas

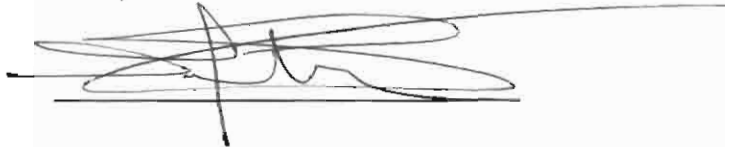
El día 30 de Octubre del año de 2006.

Jurado:

Cotutor: Dr. Ángel Horacio Sandoval Trujillo



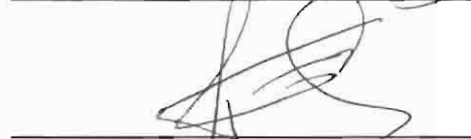
Cotutor: Dr. Álvaro Aguilar-Setién



Asesor: Dr. Víctor Rubén Tenorio Gutiérrez



Sinodal: Dr. Jorge I. Torres Barranca



Sinodal: Dr. Ricardo Flores Castro

