

T
531

90909



POSIBLE ANALOGÍA ENTRE EL FACTOR ANTI-INFLAMATORIO FILM
PRODUCIDO POR *ENTAMOEBAS HISTOLYTICAS* Y LA PROTEÍNA N DEL
VIRUS DE LA RABIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A :

M. en C. MARÍA ESTHER MORALES MARTÍNEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARIA GUADALUPE RICO ROSILLO


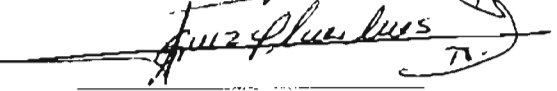
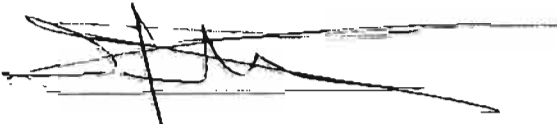
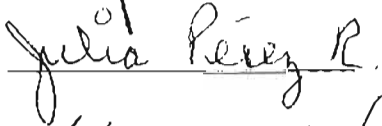
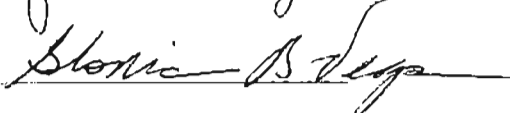
MÉXICO, D. F.

2005

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de las Unidades Ixtapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

M. en C. María Esther Morales Martínez

COMITÉ TUTORIAL

TUTOR	DRA. MARIA GUADALUPE RICO ROSILLO	
ASESORES	DR. JOSÉ LUIS GÓMEZ OLIVARES	
	DR. JOSÉ ÁLVARO AGUILAR SETIÉN	
SINODALES	DRA. JULIA PÉREZ RAMOS	
	DRA. GLORIA BERTHA VEGA ROBLEDO	

Este trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Hospital de Pediatría. Centro Médico Nacional siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social. La investigación fue financiada por CONACYT grant No. 34214B.

La sustentante agradece la beca otorgada por el Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana incluido en el padrón Nacional de Posgrado del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

En Memoria de mis padres Luis y María quienes sembraron en mí el deseo de aprendizaje y su
recuerdo es un sostén en mi vida

A mis hermanos: José Luis, Roberto, José de Jesús y Socorro, quienes siempre están presentes
cuando los necesito.

Agradecimientos

A la Dra. Guadalupe Rico por brindarme su profesionalismo y valor humano

Al Dr. Álvaro Aguilar por su apoyo invaluable

Al Dr. José Luis Gómez por sus consejos y sugerencias

A la Dra. Julia Pérez y Dra. Gloria Vega por su aporte de conocimientos para la culminación de la tesis.

Al Dr. Rogelio Alonso quién me permitió realizar parte de este trabajo de tesis en su Laboratorio de Genética Molecular. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM y a la Dra. Refugio Cortés por su gran apoyo profesional.

A todos mis compañeros de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del CMN siglo XXI, quienes en menor o mayor grado me apoyaron para la realización de esta tesis.

ÍNDICE

Abreviaturas	1
Resumen	3
Summary	4
I. Antecedentes	5
1a. Amibiasis y <i>Entamoeba histolytica</i>	5
1b. Amibiasis y FILM (Factor inhibidor de la locomoción de los monocitos)	6
1c. Reacción Inflamatoria en la amibiasis	8
1d. Fagocitosis y quimiotaxis	10
1e. Estallido respiratorio	11
2. Rabia y virus de la rabia	12
2a Estructura	14
2b Respuesta Inmune	15
2c Protección	17
2d Superantígenos	21
2e Análisis estructural de la proteína N	22
2f Fosforilación	23
2g Proteína N recombinante	26
2h Virus de la rabia como vector	26
2i La proteína N en el diagnóstico de la rabia	28
II. Hipótesis	30
III. Objetivos	30

a	Generales	
b	Específicos	
IV.	Material y Métodos	31
1a.	Obtención de Nucleocápside	31
1b	Purificación de NC por HPLC	31
1c	Purificación de NC con CsCl	31
2	Pruebas Biológicas	
2a	Estallido respiratorio	32
2b	Bloqueo de la NC con un anticuerpo anti-NC	33
3	Obtención de la proteína N recombinante	33
3a	Obtención de RNA del Virus de la Rabia	33
3b	Integridad del RNA	34
3c	Obtención de DNA por RT-PCR	34
3d	Amplificación por PCR	34
3e	Purificación del producto de PCR	35
3f	Ligación del gen pN con el plásmido pUC-19	35
3g	Transformación bacteriana	36
3h	Orientación usando un primer universal y específico para proteína N	36
3i	Corte con BamHI para la liberación del DNA	37
3j	Ligación del gen pN a un pFast-Bac Hta/BamHI/FAC	38
3k	Transposición en células DH10BAC	39
3l	Aislamiento del ADN del bécido recombinante	39
3m	Cultivo en células de insecto Sf9	39

3n	Transfección en células de insecto Sf9	40
3ñ	Detección de la pN recombinante por Inmunofluorescencia	40
3o	Infección de células de insecto	41
3p	Cosecha de la pN	41
4	Purificación de la pNr en base a su cola de histidinas	41
4a	Desalado de la pN purificada	42
5	Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras	42
6	Especificidad de la pN purificada con su anticuerpo (Dot blot)	43
2c	Locomoción celular	44
2d	Hipersensibilidad retardada cutánea al DNCB en cobayos	45
7	Análisis estadístico	47
V.	Resultados	48
VI.	Discusión	52
VII.	Conclusiones	56
VIII.	Referencias	57
IX.	Figuras	68

ABREVIATURAS

Ab	anticuerpo
BACNF	primer frontal
BACNR	primer posterior
BamHI	enzima de restricción
BHK-21	células de riñón de hámster
BSA	albúmina sérica bovina
CMH-1	Complejo mayor de histocompatibilidad de clase I
cDNA	complementario del ácido desoxirribonucleico
DEPC	dietilpirocarbonato
DNTP	dinucleótidos trifosfatos
DNA	ácido desoxirribonucleico
DNCB	dinitroclorobenceno
DTT	ditiotreitól
EDTA	etilendiamino tetracético
ER	estallido respiratorio
FM	fagocitos mononucleares humanos
HLA-DR	Antígeno leucocitario humano relacionado al locus DR
I.C.	Intracraneal
kDa	kilodalton
LB	medio Luria-Bertani
LD ₅₀	dosis letal 50
MOPS	ácido 3-[N-Morfolino] propanesulfónico
NaI	Yoduro de sodio
NC	Nucleocápside
NT	solución NaCl, Cloruro Tris
New wash	solución NaCl, Tris, EDTA, etanol
pb	pares de bases
PEG	polietilenglicol
PMN	polimorfonucleares
PV	Virus Pasteur
RNAasa	enzima ribonucleasa
RNA _m	ácido ribonucleico mensajero
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con Transcriptasa reversa
SAZ	suero activado con zimosan
SDS	duodecíl sulfato de sodio
SFB	suero fetal bovino
SOC	medio SOC
SSF	solución salina fosfatos

<i>Taq</i>	polimerasa de <i>Thermus aquaticus</i>
TBE	solución tris base, ácido bórico, EDTA
TB medium	medio Broth Terrific
TEMED	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamino
URLs	unidades relativas de luz
VR	Virus de la rabia
VSV	Virus de la estomatitis vesicular
ZO	zimosan opsonizado

RESUMEN

La Amibiasis y la Rabia son problemas de salud pública que tienen en común un pobre efecto anti-inflamatorio en los órganos blancos que afectan. En el Gene bank, se encontró que el péptido anti-inflamatorio FILM (factor inhibidor de la locomoción de monocitos) producido por *Entamoeba histolytica* homologa ochenta por ciento con un fragmento de la proteína N del virus de la rabia. La proteína N es la que primero se produce y en grandes cantidades con respecto a las otras proteínas del virus de la rabia. Esto permitió especular si la proteína N podría contribuir a la escasa reacción inflamatoria producida por el virus de la rabia en el Sistema Nervioso Central. La proteína N fue obtenida por tecnología de DNA recombinante, usando un sistema de expresión de baculovirus y fue estudiada *in vitro* e *in vivo* realizando las pruebas inmunológicas que altera el FILM [estallido respiratorio, quimiotaxis, e hipersensibilidad retardada cutánea al 1-chloro-2-4-dinitrobenzene (DNCB)]. La proteína N recombinante, como el FILM, inhibió el estallido respiratorio en fagocitos mononucleares (43%, $p < 0.05$) pero opuesto al FILM incrementó la quimiotaxis y no inhibió la hipersensibilidad retardada cutánea al DNBCB en cobayos. Se concluyó que la secuencia completa de la proteína tiene que estar presente o tiene que ser cortada y estar libre de la gran molécula de la proteína N (55 kDa) para llegar a ser activa, el residuo de -Ser- en particular el segmento ácido terminal ...-Cys-Asn-Ser... del péptido puede ser crítico para la función del FILM.

SUMMARY

Amebiasis and Rabies are public health problems and they have in common a poor inflammatory effect in the target organs that they affect. In the Gene bank, it was found that the anti-inflammatory peptide MLIF (monocyte locomotion inhibitory factor) produced by *Entamoeba histolytic* homologates eighty percent with a fragment of the N protein of the rabies virus. This protein is produced earlier and in larger quantities than other viral proteins. We speculated if the N protein could contribute to the scant inflammatory reaction produced by rabies virus in Central Nervous System. The N protein was obtained by recombinant DNA technology, using the baculovirus expression system and was studied *in vitro* and *in vivo* doing the same immunological tests altered by MLIF [respiratory burst, chemotaxis, delayed hypersensitivity skin reaction to 1-chloro-2-4dinitrobenzene (DNCB)]. The recombinant N protein, as MLIF, inhibited the respiratory burst in human MP (43%, $p < 0.05$) but in contrast to MLIF it increased chemotaxis and it did not significantly inhibit delayed hypersensitivity skin reaction to DNCB in guinea pigs. We concluded that the full peptide sequence has to be present or it has to be cleaved-free from the large recombinant N protein molecule (55 000 Da) to become active, the –Ser- residue in particular the ...Cys-Asn-Ser... acid terminal segment of the peptide may be critical for MLIF function.

ANTECEDENTES

La amibiasis y *Entamoeba histolytica*

La amibiasis es una de las enfermedades parasitarias causada por la *Entamoeba histolytica* que afecta predominantemente a individuos de bajo nivel socioeconómico (Ravdin 1995, Celis y Alva 1970). La infección se presenta en todo el mundo, principalmente en Africa, América del Sur y la India (Walsh 1988). La amibiasis está presente en aproximadamente 500 millones de portadores de los cuáles 50 millones de casos son de amibiasis invasora y solamente 500 mil presenta absceso hepático amibiano (AHA) con una cifra promedio de 40,000-100,000 muertes anuales (Walsh 1986, Walsh 1986b; Walsh 1988) por lo que la morbilidad y la mortalidad son considerables.

En México, la amibiasis es uno de los problemas prioritarios de salud. En la mayoría de los individuos infectados, la *E. histolytica* vive como comensal (Trissl *et al.* 1977) y solamente un pequeño porcentaje de éstos causa enfermedad al invadir la mucosa del colon. Esta invasión provoca una colitis inflamatoria, la cual puede determinar la diseminación del parásito al hígado y producir AHA. Cuando el AHA se ha establecido, o en su caso se ha presentado una perforación intestinal, es posible que se puedan presentar complicaciones como: a) compromiso pleural, b) pericarditis, c) peritonitis o d) formación de fístulas cutáneas (Ravdin y Guerrant 1982). No esta claro si el AHA puede ser considerado como una consecuencia de la disentería (Kretschmer 1994).

Los factores que permiten la aparición y resolución de la amibiasis invasora son múltiples, probablemente se relacionen con un balance entre los mecanismos patogénicos del parásito y los mecanismos de defensa del huésped, tanto inmunológicos como no inmunológicos.

Amibiasis y FILM (Factor inhibidor de la locomoción de los monocitos)

En el absceso hepático amibiano llama la atención la escasez de elementos inflamatorios en los estadios avanzados (Pérez-Tamayo y Brandt 1971). Para explicar este fenómeno se han propuesto fundamentalmente dos hipótesis, que no resultan necesariamente excluyentes: la citolítica y la anti-migratoria. Según la primera, la amiba destruiría los leucocitos conforme éstos fueran arribando al tejido infectado. Hay datos experimentales que avalan este mecanismo (Jervis y Takeuchi 1979). La hipótesis anti-migratoria sugiere que *E. histolytica* podría producir y liberar factores capaces de inhibir el arribo de los leucocitos al foco de la infección. Esta hipótesis fue planteada por Pérez-Tamayo en 1971 (Pérez-Tamayo y Brandt 1971). La falta de estos elementos inflamatorios tardíos pueden a su vez, estar relacionados con la ausencia de tejido cicatricial y en consecuencia con la perfecta regeneración del parénquima hepático. En relación con esta segunda hipótesis, en 1985 Kretschmer *et al.* (Kretschmer *et al.* 1985) demostraron que en el sobrenadante de cultivos axénicos de *E. histolytica* se encuentra un factor dializable, capaz de inhibir *in vitro* la locomoción (aleatoria, quimiotaxis y quimiotaxis) de los fagocitos mononucleares humanos (FM), mas no la de los polimorfonucleares (PMN). El factor fue denominado “factor inhibidor de la locomoción de los monocitos” (FILM). El FILM ejerce su acción en forma dosis-dependiente y sin lesionar a los leucocitos. El FILM también afecta la locomoción de los FM *in vivo*, como lo revelaron los estudios con cámaras de Rebeck en voluntarios humanos e inhibe la hipersensibilidad por contacto al DNCB en cobayos (Giménez-Scherer *et al.* 1997).

El efecto del FILM sobre la quimiotaxis de FM puede cancelarse inhibiendo la síntesis de proteínas en los FM mediante la exposición a la cicloheximida. El factor lo generan las amibas independientemente de su patogenicidad y virulencia. Por ultra-filtración escalonada y

cromatografía analítica (Sephadex G-15), el FILM reveló ser una molécula de 735-478 daltones, termoestable y almacenable por meses a -70°C sin pérdida de su actividad biológica (Kretschmer *et al.* 1985).

El FILM modifica los rasgos morfológicos asociados a la locomoción celular (aplanamiento celular y número de pseudópodos) así como los de orientación celular (desplazamiento caudal del núcleo y disposición cefálica de los organelos), pero sobre todo, induce un aumento importante de microtúbulos asociados al centriolo, como lo demostraron estudios ultraestructurales cuantitativos realizados por (Giménez-Scherer *et al.* 1987).

El material del lisado de amibas lavadas exhaustivamente y procesado según el método de Aley *et al.* 1980, contienen igualmente esta actividad leuco-inhibidora, lo que sugiere que el FILM es producido por las amibas, hecho comprobado con estudios de marcaje con cisteína donde se verificó que, efectivamente, el FILM se sintetiza de *novo* y no por ingestión-digestión y regurgitación de algún componente del medio (Rico *et al.* 1997). El factor inhibidor puede absorberse a FM y recuperarse subsecuentemente por elución ácida, lo cual sugiere una interacción dinámica y reversible entre el FILM y su receptor sobre la membrana de los FM. Los PMN absorben el FILM solo parcialmente, mientras que los linfocitos no parecen hacerlo (Kretschmer *et al.* 1986). El tratamiento del FILM con peryodato no modifica su efecto inhibidor de la quimiotaxis de FM. En cambio, el tratamiento de los FM con ConA o con peryodato cancela, o al menos disminuye significativamente el efecto inhibidor, lo que sugiere que el FILM no contiene carbohidratos con grupos vecinales OH-OH o OH-NH₂, mientras que, él o los receptores para el FILM si los contiene. Cuando el ensayo de la quimiotaxis inhibida por el FILM se realiza en presencia de diversos carbohidratos, sólo se observa disminución significativa de la inhibición usando D-manosa, 4-O- β -galactosil-D-

manósido y manana, pero no otros carbohidratos (incluyendo glucosa y fucosa lo que sugiere que el FILM no es equivalente a MIF) (Kretschmer *et al.* 1991).

Estudios subsecuentes revelaron que el FILM utilizado a concentraciones equivalentes a las empleadas en los estudios leucotácticos no sólo inhibe la locomoción de los FM, sino también es capaz de abatir de hecho prácticamente cancelar su estallido respiratorio (medido por quimioluminiscencia), aunque este efecto también lo ejerce sobre los PMN neutrófilos (PMNn) (Rico *et al.* 1992). Esto puede o no ser relevante en la interacción de *E. histolytica* y los FM activados, ya que estas células son capaces de destruir amibas virulentas por mecanismos oxidativos y no oxidativos (Salata *et al.* 1985) y en el caso de roedores, mediante óxido nítrico (NO) (Wang *et al.* 1994). En los PMNn esta acción del FILM podría contribuir en la notoria incapacidad para interactuar *in vitro* con *E. histolytica* virulenta, sobre todo porque la lisis que los PMN logran sobre *E. histolytica* no virulentas o aquellas atenuadas con emetina o calor, ocurre exclusivamente por mecanismos oxidativos (Ravdin y Guerrant 1982).

Reacción inflamatoria en la amibiasis

La inflamación es un fenómeno biológico muy complejo, quizás el más complejo dentro de lo que llamamos inmunidad innata o natural. La inflamación está constituida por una serie de eventos en el que participan los vasos sanguíneos (vénulas postcapilares y su sistema de selectinas), elementos de la sangre (humorales y celulares con su sistema de integrinas, quimiotaxinas y opsoninas) y por otra parte, el tejido intersticial.

La inflamación tiene como ventaja selectiva, la cicatrización, que junto con la regeneración celular permite la restitución tisular.

La respuesta inicial está caracterizada por la liberación de sustancias vasoactivas que producen vasodilatación y edema, seguida por la activación del sistema de la coagulación, y del sistema

del complemento. Se producen factores quimiotácticos para neutrófilos y otras células inflamatorias.

Las características de la inflamación agudas son: formación de edema y presencia de neutrófilos.

Las características de la inflamación crónica son: incremento en el número de macrófagos, linfocitos, eosinófilos y depósito de fibrina.

La reacción inflamatoria que acompaña a la amibiasis invasora por *E. histolytica* es atípica en varios aspectos (Pérez-Tamayo y Brandt 1971). A pesar de que en las fases tempranas se observa una inflamación aguda muy intensa, que contiene algunos eosinófilos, en los estadios avanzados, sobre todo en el AHA, llama la atención la escasez de reacción inflamatoria tardía (mononucleares). Esta observación, por cierto, fue documentada hace ya más de un siglo. La escasa reacción inflamatoria tardía, podría contribuir a la igualmente inusitada regeneración hepática que ocurre, sin traza de tejido cicatricial, en los individuos que se recuperan de AHA gracias al tratamiento médico.

El AHA por lo general consiste en áreas masivas de necrosis compuestas de material granular eosinofílico y necrótico con restos nucleares, pocos leucocitos, pocas amibas o ninguno de estos últimos (Pérez-Tamayo 1986). Histológicamente, la formación de AHA después de la inoculación intraportal de amibas virulentas en el hámster incluye tres etapas: reacción inflamatoria aguda, formación de granuloma y necrosis progresiva. Se supone que la destrucción de las células no resulta del contacto directo con los trofozoitos amibianos, sino que esta mediada por la lisis de los leucocitos PMNn que liberan productos citotóxicos dañando a los hepatocitos (Tsutsumi y Martínez-Palomo 1988).

Fagocitosis y Quimiotaxis

Los fagocitos tienen la capacidad de moverse en respuesta a un estímulo quimiotáctico, la locomoción puede ser aleatoria o quimiotáctica. La aleatoria es multidireccional y las células se mueven en cualquier dirección, mientras que la quimiotaxis es un movimiento unidireccional en respuesta a un gradiente de concentración de un atrayente químico o de quimiotaxinas. La locomoción aleatoria al ser estimulada, recibe el nombre de quimiocinesis, este movimiento ocurre cuando un quimioatractante interactúa con un leucocito, pero en ausencia de un gradiente de concentración (Ward y Maderazo 1980).

Hay tres tipos de locomoción: movilidad aleatoria, quimiocinesis y quimiotaxis en los leucocitos, aunque *in vivo*, el tipo de movilidad que fundamentalmente lleva a los leucocitos hacia un foco inflamatorio es la quimiotaxis (Kretschmer *et al.* 1980), en donde las células migran al sitio de lesión o infección, en respuesta a quimioatractantes. Las quimiotaxinas son producidas por bacterias, células inflamatorias o tejido dañado involucrado en la reacción inflamatoria. Factores del complemento como C3a o C5a, también desempeñan esta función (Ward y Maderazo 1980, Sigal y Yacov 1994).

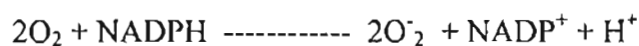
Los fagocitos tienen receptores para los quimioatractantes, éstos pueden ser de alta o baja afinidad y encontrarse en diferente proporción, lo que ocasiona una respuesta quimiotáctica dosis-dependiente. La interacción del quimioatractante con su receptor inicia la transducción de señales y la adherencia (incremento de calcio intracelular libre, alteraciones de fosfolípidos de membrana con activación de proteínas G (que unen GTP), fosfolipasa C, proteína-cinasa C y proteína-cinasa dependiente de AMPc. Estos eventos inducen un incremento en la carga negativa de la membrana, y aumentan su adhesión a la matriz tisular, lo que se ve favorecido por receptores de los fagocitos a componentes de la matriz extracelular como la laminina y

fibronectina, así como por el receptor para el fragmento C3b del complemento. A este proceso se unen los cambios propiamente migratorios del citoesqueleto. Como resultado de estos eventos bioquímicos, las células migran hacia donde asciende el gradiente y se detienen en donde las células encuentran un máximo de quimioattractante. Una vez en el sitio, se produce la elongación de pseudópodos y el englobamiento de partículas, lo que se facilita por receptores para C3b y la porción Fc de los anticuerpos, finalmente los lisosomas de los fagocitos se fusionan con el fagosoma (Sigal y Yacov 1994). *In vitro*, las células tienen la capacidad de emigrar direccionalmente a lo largo de un gradiente de concentración. La locomoción puede estudiarse de varias maneras: en tubo capilar, bajo agarosa y en cámaras especiales. El uso de la cámara de Boyden es el método más apropiado, usa uno o dos filtros para separar los compartimentos (superior e inferior). El tamaño de los poros de los filtros varía de acuerdo al tipo de célula que se desea estudiar. El filtro inferior con poros de 8 micras tiene una gran tortuosidad que impide el paso libre de los leucocitos, convirtiéndose así en un filtro atrapador (Kretschmer y Collado 1980), en el que se retienen las células.

Estallido respiratorio

Durante la fagocitosis ocurre el estallido respiratorio (ER) y la actividad microbicida, donde se generan moléculas excitadas y radicales libres como aniones superóxido (O_2^-), singulete de oxígeno ($1/2 O_2$) radical hidroxilo (OH^\cdot), peróxido de hidrógeno (H_2O_2) e hipoclorito (OCl^-).

Inicialmente una oxidasa membranal (NADPH) oxida al DNP o NADH para formar el anión superóxido (O_2^-) y NADP o NAD, a través de la siguiente reacción.



El superóxido reacciona con iones hidrógeno espontáneamente o con superóxido dismutasa para formar peróxido de hidrógeno (H_2O_2) o puede reaccionar con el superóxido de hidrógeno

ya formado para producir radicales hidroxilo, los cuales son todavía más reactivos (Sigal y Yacov 1994, Espinosa *et al.* 1997). El NADP y el H₂O₂ adicionalmente estimulan el desvío de la hexosa monofosfato (HMP) la cual produce más NADPH disponible, incrementando la utilización de la glucosa y la producción de lactato. La muerte dependiente del oxígeno ocurre cuando la mieloperoxidasa (MPO) y un haluro catalizan la formación de radicales oxidativos a partir de H₂O₂ o bien por la capacidad intrínseca del H₂O₂. La muerte dependiente de oxígeno involucra la halogenación de la pared celular microbiana, la producción de aldehídos bactericidas, por descarboxilación de aminoácidos y el rompimiento oxidativo de enlaces peptídicos en las proteínas bacterianas. La MPO es llevada al fagosoma por degranulación, mientras que los haluros penetran posiblemente por difusión.

La relajación hasta su estado basal, de las moléculas excitadas y los radicales libres como el singulete de oxígeno generados durante la fagocitosis, da como resultado la emisión de energía en forma de quimioluminiscencia (QL), llamada QL “nativa”, que es la energía no destructiva por la actividad oxidativa de los fagocitos (Hemming *et al.* 1976) ésta es muy débil y no puede ser fácilmente medible, pero puede ser amplificada con la adición de compuestos como el luminol (5 amino-2-3 dihidro 1,4 ftalazinadiona) que interactúa con las especies oxidativas para producir cantidades más grandes de luz con una longitud de onda de 425 nm (Helfand *et al.* 1982). El aumento de esta energía permite mostrar la actividad fagocítica de manera continua.

Rabia y virus de la rabia

La rabia es una enfermedad contagiosa que afecta a los animales y al hombre. Se considera un problema de salud a nivel mundial (OMS), (Hostnik y Bidovec 1999) se transmite por

inoculación del virus de la rabia (VR) a través de la mordedura de perros, gatos, murciélagos, zorros que tienen la enfermedad. La infección por la mordedura usa como vehículo a la saliva que se deposita en el músculo estriado, sitio en el que se replica hasta alcanzar una concentración suficiente para llegar a un nervio sensorial o motor, donde se une a receptores de acetilcolina y entra al Sistema Nervioso Central (SNC), infecta a las neuronas y causa un comportamiento aberrante al que se le llama “rabia furiosa” si la infección penetra a la neurocorteza recibe el nombre de “rabia silenciosa”, el cuadro clínico cambia y puede presentarse depresión, coma y muerte por paro respiratorio (Murphy *et al.* 1999).

El período de incubación entre la mordedura y la presencia de signos del SNC es entre 14 y 90 días y depende de la distancia de la mordedura al SNC, ocasionalmente dura años, y esto puede deberse a que el virus permanece secuestrado en el músculo estriado (Murphy *et al.* 1999).

La rabia es una de las pocas enfermedades que después de la exposición al virus, puede ser prevenida en humanos por vacunación, probablemente debido al largo período de incubación de la enfermedad. La rápida aparición de anticuerpos neutralizantes, dirigidos contra la glicoproteína G del virus, parece estar relacionada con la eficacia de la protección (Herzog *et al.* 1991, Wiktor *et al.* 1973).

La enfermedad es ocasionada por la replicación de el virus de la rabia, que presenta una cadena de ácido ribonucleico en sentido negativo lo que lo incluye en el orden de los mononegavirales, pertenece a la familia de los *Rhabdovirus* y al género *Lyssavirus* que tienen como característica estructural la forma de una bala. Se conocen seis diferentes genotipos (GT): GT 1 que incluye a los virus de las rabias clásicas y a las cepas vacunales, mientras GT 2-6 están relacionados con la rabia e incluyen el virus Lagos bat (LB: GT 2); virus Mokola

(Mok: GT 3); el virus Duvenhage (Duv: GT 4); el *Lyssavirus* de murciélago Europeo 1 (EBL-1: GT 5); y el *Lyssavirus* de murciélago Europeo 2 (EBL-2: GT 6) (Herzog *et al.* 1991). Las vacunas actuales de la rabia dan protección contra GT 2 y GT 3 (Drings *et al.* 1999).

La rabia clásica (GT 1) tiene distribución universal y ataca a la mayoría de los mamíferos. Los otros *Lyssavirus* están más limitados en su distribución geográfica y en cuanto a las especies que afectan.

Estructura

El VR mide 100 a 300 nm de largo y 75 nm de ancho, presenta cinco proteínas estructurales: G, M2, L, M1 y la proteína N (N). La cubierta de lípidos y glicoproteína constituye la glicoproteína G (proteína G) y hacia ella se producen los anticuerpos neutralizantes. La proteína de membrana o matriz (proteína M2) juega un papel importante como intermediario y catalítico entre y dentro de la envoltura viral y la nucleocápside (NC). Una transcriptasa (proteína L) que está formada de 2142 aminoácidos, representa el 54% del genoma, y es importante en la transcripción. La fosfoproteína (proteína NS o proteína M1 o proteína P) formada por 297 aminoácidos, tiene dos formas con diferentes extensiones de fosforilación, originalmente considerada como componente de la envoltura viral. La proteína P se une a la N para la síntesis del RNA viral, esta unión se asocia con la cadena ligera de la dineína celular, la cual está involucrada en el transporte de la NC viral a través de los axones neuronales. Toriumi *et al.* con el propósito de conocer la conformación funcional y los cambios conformacionales de la proteína P, usaron un anticuerpo monoclonal (# 402-13), e identificaron un epítipo lineal localizado en la región C-terminal de la proteína P el cual debe de tener una conformación específica para ser expuesto, solo cuando la proteína P está asociada a la NC (Toriumi *et al.* 2002). La región del epítipo es esencial para que la proteína P

se asocie con la NC pero no para la formación de complejos libres de N-P con nueva proteína N sintetizada.

La proteína N (nucleoproteína) encapsida al RNA viral eficiente y específicamente para formar el complejo ribonucleoproteína que proporciona el molde para la transcripción y replicación del RNA por el complejo de polimerasa viral el cual incluye la proteína P y la L (Koser *et al.* 2004). La proteína N constituida por 450 aminoácidos, interviene en la inmunidad humoral y celular y es la de mayor importancia diagnóstica para detectar su antígeno. Las proteínas internas L, N y P están formando un complejo con el RNA viral para formar la nucleocápside (RNP o ribonucleoproteína) (Hostnik y Bidovec 1999, Wiktor *et al.* 1973, Ertl *et al.* 1989, Wu *et al.* 2002). El genoma del VR mide aproximadamente 12Kb y codifica para cinco RNAs mensajeros monocistrónicos que traducen para las cinco proteínas descritas (Conzelmann *et al.* 1990).

Respuesta Inmune (RI)

Para estudiar la respuesta inmune en la infección por el VR se han realizado diferentes estudios: Titulación de anticuerpos neutralizantes, índices de proliferación celular, cinética de multiplicación del virus, síntesis de óxido nítrico, expresión del gen óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), producción de citocinas [interferón γ (IFN- γ), interleucina 2, 4 y 10 (IL2, IL4, IL-10)], linfocitos T citotóxicos, así como expresión del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase I.

Los virus EBL-1 y EBL-2 han sido aislados de murciélagos europeos y son los responsables de muertes humanas, ésta es una de las razones por las cuáles Herzog *et al.* en 1991 evaluaron las respuestas de células B y T al *Lyssavirus* de murciélago europeo 1. Estudiaron a un grupo

de pacientes sanos, sin vacunación previa que estuvieron expuestos a la mordedura de un animal rabioso, se les inmunizó con la cepa PM (Pitman-Moore) post exposición y midió *in vitro* los títulos de anticuerpos neutralizantes e índices de proliferación celular, en este estudio no se encontró correlación entre la respuesta de células B y T en respuesta a EBL-1 (Herzog *et al.* 1991).

La respuesta inmune del huésped puede jugar un papel importante en el desarrollo de la encefalitis (Drings *et al.* 1999, Ertl *et al.* 1989, Iwasaki *et al.* 1977). Se tiene evidencia que el VR puede permanecer secuestrado por largos períodos de tiempo. En humanos hay títulos de anticuerpos solo cuando están presentes los síntomas neurológicos y en las últimas etapas de la enfermedad cuando ocurre la muerte. En 1977, Iwasaki *et al.* estudiaron en ratones el papel de la RI del huésped en el desarrollo de enfermedad encefálica o paralítica después de la infección por rabia experimental. Trabajaron tres grupos de ratones (controles normales, inmunodeprimidos y atímicos). Después de administrar la cepa ts2 CVS de VR se analizó la cinética de multiplicación del virus en SNC y los títulos de anticuerpos. En los animales control hubo parálisis severa, causando un 80% de muertes, acompañada de inflamación marcada y destrucción del tejido parenquimatoso del SNC, raramente se aisló el VR y hubo producción de anticuerpos contra la rabia; mientras que los inmunodeprimidos (ciclofosfamida) desarrollaron síntomas de encefalitis, en menor grado parálisis, muerte del 100%, los cambios histológicos fueron degeneración y necrosis de neuronas, se aisló el virus en todos los ratones pero no se detectaron niveles de anticuerpos. En el caso de los ratones atímicos (inmunodeficientes) los síntomas fueron similares a los inmunosuprimidos pero con producción de anticuerpos IgM. Se concluyó que la RI del huésped es benéfica en la infección

por el VR y es importante en la destrucción del tejido parenquimatoso y ascenso de la parálisis de extremidades.

En los ratones inmunocompetentes (controles) la destrucción del tejido parenquimatoso posiblemente se deba a la RI humoral y celular del huésped por la generación de anticuerpos citolíticos y a la generación de células citotóxicas en la infección por el VR. La ausencia de destrucción de tejido parenquimatoso en inmunodeficientes (atímicos) sugiere una dependencia del timo, y la presencia de anticuerpos IgM indica que éstos no participan en la destrucción del tejido parenquimatoso (Iwasaki *et al.* 1977).

Sukathida evaluó la síntesis de óxido nítrico y la expresión del gen de iNOS para estudiar el mecanismo patológico de daño cerebral y funcional de las neuronas durante la infección por el VR, concluyeron que la inhibición de iNOS retrasa la muerte de los ratones infectados con el VR al afectar la replicación viral y la apoptosis de las células infectadas (Sukathida *et al.* 2001).

Protección

La glicoproteína y la nucleoproteína son los antígenos inductores más importantes para conocer si hay protección contra la rabia. A diferencia de la proteína G, la proteína N es la proteína más conservada a través de los diferentes genotipos, estimula la producción de células T cooperadoras (T_H), (Ertl *et al.* 1989) induce protección cruzada contra retos intramusculares y estimula la producción de anticuerpos neutralizantes inducidos por las vacunas clásicas.

Se estudió la RI en humanos a dos antígenos: la NC y la glicoproteína en pacientes con rabia y pacientes vacunados (virus crecido en células Vero), los resultados indicaron que el proceso de reconocimiento inmune y desarrollo de anticuerpos ocurre tempranamente y la reactividad a la



proteína N puede ser de importancia para la producción de anticuerpos neutralizantes (Kasempimolporn *et al.* 1991).

La IL-2 aumenta la protección en rabia experimental, cuando se inyecta exógenamente a ratones, esta citocina exhibió un efecto adyuvante en las vacunas del VR y en las subunidades de estas vacunas (Perrin *et al.* 1988).

La NC requiere de una interacción física entre las proteínas N y G para tener un efecto adyuvante. Esto es el resultado de una presentación de productos derivados de ambas proteínas por una misma célula presentadora de antígeno. Así, las células T_H específicas para las proteínas N y G pueden actuar sinérgicamente para estimular a los linfocitos B para producir anticuerpos neutralizantes (Ertl *et al.* 1989).

Linfocitos T de pacientes inmunizados con la cepa vacunal PM se estimularon con IL-2, y se encontró que los linfocitos T proliferan en respuesta a antígenos de rabia solo cuando las células presentadoras de antígeno expresan antígeno HLA-DR. La estimulación de estos linfocitos con antígenos de rabia específicos indujo la producción de IFN γ (Celis *et al.* 1986).

La proteína N de la rabia influye sobre las células citolíticas o células T ofreciendo protección contra la rabia en animales (Dietzschold *et al.* 1987). Los linfocitos T citotóxicos juegan un papel muy importante en la eliminación de virus infeccioso ya que la RNP del VR es un excelente inductor del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH-I). La RNP del VR produce inmunidad protectora sin que se conozcan aún los mecanismos de protección (Kasempimolporn *et al.* 1991). Los antígenos de la nucleoproteína activan la proliferación de las células B para que proliferen, la proteína N del VR en el complejo RNP induce una potente respuesta de células T lo que ocasiona una respuesta inmune humoral contra el VR.

Actualmente algunos investigadores han incorporado genes extraños dentro del genoma del VR produciendo un virus recombinante que permite examinar así la inmunogenicidad a antígenos extraños. Se construyó un VR recombinante que expresa la proteína de fusión N-GFP del VIH-1, la cual se produjo e incorporó eficientemente a la RNP induciendo en ratones una respuesta inmune humoral a diferencia de la proteína GFP sola. Estos datos indican que la nucleoproteína del VR se puede usar como acarreador para antígenos extraños, y puede ser útil para el uso del VR como vector en vacunas muertas contra otras enfermedades infecciosas (Koser *et al.* 2004). La glicoproteína de la rabia unida a liposomas *in vitro*, induce síntesis de citocinas específicas. La producción de IL-2 en células esplénicas de ratones inmunizados con antígenos del virus de la rabia presentados como inmunosomas (liposomas cubiertos de glicoproteína) fueron tan activos como los virus inactivados, mientras que la glicoproteína purificada fue inactiva (Oth *et al.* 1987).

Celis *et al.* (1988) reportaron que la inmunización con RNP del VR purificada no indujo anticuerpos neutralizantes pero protegió a los animales contra un reto viral periférico, aunque no existan anticuerpos neutralizantes al momento del reto, la presencia de T_H facilita la respuesta inmune rápida de los antígenos presentes en el reto viral (Oth *et al.* 1987).

Mediante péptidos sintéticos se identificaron *in vitro* los epítomos inmunodominantes de la NC e *in vivo* por la estimulación de linfocitos T específicos, lo que resultó en un incremento de la respuesta de células T y una rápida producción de anticuerpos neutralizantes con VR inactivado (Ertl *et al.* 1989).

Perrin *et al.* (1996) estudiaron la producción de citocinas de células T en respuesta a varios *Lyssavirus* (antígenos de rabia) en ratones BALB/c, se evaluaron IL-2, IL-4, IFN- γ , así como

sus RNAm. Sólo los ratones infectados con virus patógenos perdieron la capacidad de producir citocinas *in vitro* después de estimulación antigénica específica. En ratones infectados con virus no patógeno sí hubo producción de citocinas. Así, la infección con antígenos de rabia patógeno por la ruta periférica induce en los ratones BALB/c una pérdida de respuesta de células T después de activación antigénica específica, pero no después de activación policlonal por el mitógeno Concanavalina A. Concluyeron que en el ratón, la pérdida de la respuesta inmune está relacionada con la severidad de la enfermedad. La no respuesta de células T depende solo de la severidad de la enfermedad en el ratón (Perrin *et al.* 1996).

En otro estudio realizado por Hooper *et al.* (1994) inmunizando ratones con RNP por vía oral, encontraron un aumento en la respuesta inmune, demostrando especificidad en respuesta celular y producción de anticuerpos contra la proteína N (Hooper *et al.* 1994).

La inmunidad celular y los interferones pueden reducir la carga viral, los anticuerpos virus específicos y particularmente los anticuerpos neutralizantes al virus juegan un papel muy importante en el control de la mayoría de las infecciones virales que afectan el SNC (Hooper *et al.* 1998). Perrin reportó que la IL-2 aumentó la protección en rabia experimental. Sin embargo, en un estudio previo en el que inducen la producción de IL-2 y anticuerpos en células humanas de sangre periférica de individuos vacunados con cepas PM o virus Pasteur no se encontró correlación entre la producción de IL-2 y los niveles de anticuerpos neutralizantes, y se concluyó que la producción de IL-2 podría ser usada para el estudio de la inmunidad celular y células de memoria en la vacunación anti-rábica efectuada en humanos (Perrin *et al.* 1991).

Superantígenos

Los superantígenos (SAg) pueden activar gran número de linfocitos T, ya que no son internalizados ni procesados por las células presentadoras de antígeno. Menos del 0.01% de linfocitos T responden a un SAg convencional, entre 5 y 25% de linfocitos T pueden responder a un SAg no convencional. En 1992 se reportó que la NC del VR es un SAg específico para linfocitos T humanos V β 8 que se une a cadenas HLA clase II α y es un potente activador de linfocitos T en las vacunas contra la rabia (Lafon *et al.* 1992).

En linfocitos de amígdalas humanas se evaluó la capacidad del SAg de NC del VR para activar la proliferación celular, la producción de citocinas y la producción de anticuerpos. La activación producida por el SAg de la NC se comparó con SAg derivados de *Staphilococcus* (SEE y TSST-1); a pesar de una débil actividad mitogénica de linfocitos T restringida a células TCD4+, la NC disparó en los linfocitos B la producción de inmunoglobulinas G (IgG) en cantidades similares a las producidas por los SAg de SEE y TSST-1, y no disparó la producción de IgM. Las citocinas producidas por activación de la NC fueron IL-4 e IL-10 lo que sugiere que el SAg de la NC induce una respuesta T_{H2}. Las citocinas producidas por activación de TSST-1 fueron IL-2 e IFN- γ lo que sugiere que TSST-1 induce una respuesta T_{H1}. El patrón T_{H2} inducido por el SAg de la NC podría explicar la capacidad para incrementar la respuesta de anticuerpos “*in vivo*” (a un antígeno inyectado simultáneamente). La NC de la rabia puede disparar la activación de células B policlonales, como otros SAg (Martínez-Arends *et al.* 1996).

Astoul *et al.* (1996) reportaron que la NC del VR es un SAg exógeno específico V β 8 en humanos y V β 6 en ratones. Estudiaron el efecto del SAg de la rabia, en respuesta a un

antígeno no relacionado, el virus de la influenza, y compararon la respuesta en dos cepas de ratones congénitas: BALB/c y BALB/d2. Los ratones BALB/c son respondedores al SAg de rabia, mientras que los BALB/d2 no responden por carecer del receptor de células T V β 6. En ratones BALB/c, la co-inyección del SAg de rabia con el virus de influenza inactivado produce un incremento rápido y de larga duración en los títulos de anticuerpos IgG e IgM específicos contra el virus, incluyendo anticuerpos protectores, inhibidores y hemoaglutinantes, también estuvo incrementada la proliferación antígeno específica, así como la secreción de IL-2 e IL-4 por linfocitos de nódulo linfoide. Cuando se compararon con los ratones que sólo recibieron el virus de la influenza. En ratones BALB/d2, no hubo ningún cambio; sin embargo, durante el establecimiento de la respuesta primaria, el aumento en las células T estimuladas estuvo restringida a células TCR V β 6. Estos datos establecen que el SAg de la rabia estimula respuestas T y B específicas a antígenos no relacionados, esta propiedad es la responsable de la capacidad adyuvante de la NC (Astoul *et al.* 1996).

Análisis estructural de la proteína N

Kawai *et al.* (1999), investigaron la maduración antigénica de la proteína N del VR con anticuerpos monoclonales, el anticuerpo monoclonal contra el epítipo lineal 5-2-26 dependiente de fosforilación es útil para estudiar procesos de fosforilación de la proteína N, encontraron que esta proteína no se fosforila inmediatamente en la serina 389, primero se asocia a la proteína P para formar la nucleocápside y posteriormente se presenta la fosforilación (Hawai *et al.* 1999).

Goto *et al.* (2000) estudiaron los sitios antigénicos de la proteína N del VR, pero ahora clasificándolos del I al IV, estos sitios están compuestos de epítomos que dependen de

linearidad y conformación. También, por medio de anticuerpos monoclonales a estos sitios y con el uso de octapéptidos sintéticos determinaron que los tres epítomos del sitio I y dos del sitio IV constituyen una pequeña región que va de 358-367 aminoácidos, así como los sitios IV en la región de 375-383 aminoácidos que son los más conservados y comunes en los *Lyssavirus*, encontraron que los epítomos en los sitios I se expresan en la forma inmadura de la proteína N y los epítomos del sitio IV se expresan en la proteína N madura (Goto *et al.* 2000).

Fosforilación

La fosforilación de las proteínas en residuos como serina, treonina y tirosina son de las formas más frecuentes de modificación pos-traducciona en células eucarióticas, que están ligadas al control de funciones celulares. Muchas proteínas virales son fosforiladas y su fosforilación juega un papel importante en el ciclo viral infeccioso. La fosforilación de algunas de las proteínas virales se realiza por cinasas asociadas al virus y otras por cinasas celulares. La fosforilación por una cinasa celular es un prerrequisito para mayor fosforilación por cinasas asociadas a virus (Wu *et al.* 2002).

La proteína N del virus de la rabia se fosforila no solo en células infectadas con virus, sino también cuando se expresa sola en células de insecto y de mamíferos, lo que sugiere que la cinasa celular más que la cinasa asociada a virus está probablemente involucrada en la fosforilación de la proteína N del virus de la rabia. En un estudio se probó que la casein cinasa II (CK-II) de origen celular es capaz de fosforilar a la proteína N del virus de la rabia *in vivo* e *in vitro*. La fosforilación de la proteína N es sobre un residuo de serina en la posición 389 (Iwasaki *et al.* 1977).

Una función importante de la proteína N a nivel estructural es encapsidar y proteger al genoma. También, está involucrada en el cambio entre la transcripción y replicación viral (Wu

et al. 2002) como se demuestra en estudios con el virus de la estomatitis vesicular (VSV), en los que se observa que la replicación no puede iniciarse en ausencia de suficiente proteína N para la encapsidación del molde de crecimiento, cuando las cantidades de proteína N permanecen bajas, la transcripción reconoce una señal de paro, y cuando son suficientes la transcripción participará en el ensamble y crecimiento del molde y no responde a la señal de paro, este evento corresponde a la transición entre la transcripción y la replicación. Esta encapsidación específica inicia en el 5' terminal de los RNAs.

Para demostrar los dominios de la proteína N que gobiernan la especificidad de unión, Kouznetzoff *et al.* (1998) probaron *in vitro* la habilidad de la proteína N en ambas formas: con longitud completa y troncada para interactuar con una sonda RNA sintética correspondiente a la 5' terminal del anti-sentido. Mostraron que en la proteína N completa y en la NH₂ terminal de 376 aminoácidos están todos los determinantes para la interacción específica. Un péptido cercano al COOH terminal de 42 (posición 298-352) localizado en la región más conservada de las proteínas N de los *Rhabdoviridae* se une directamente al RNA viral. Ambas proteínas N pueden poseer un nuevo tipo de motivo conformacional de unión a RNA y proteínas de doblamiento que contribuyen a la arquitectura del sitio de unión al RNA (Kouznetzoff *et al.* 1998).

Al mutar la serina por cualquiera de los siguientes aminoácidos: glicina, ácido aspártico, asparagina, ácido glutámico o glutamina en la posición 389 y examinar los efectos de estas mutaciones sobre la transcripción y replicación en el minigenoma produjeron una síntesis de proteína N no fosforilada y una reducción de la transcripción viral, así como de la replicación en el mismo. Las curvas de crecimiento indican que la producción del virus mutado en serina

por alanina fue 10,000 veces menos que la del virus silvestre. Los resultados indican que la fosforilación del VR es necesaria para la transcripción y replicación (Wu *et al.* 2002).

La proteína N del VR y la del VSV no tienen alto grado de homología en su secuencia primaria de nucleótidos, sin embargo ellas han conservado regiones y características similares. La proteína N del VR tiene cuatro aminoácidos conservados con homología a los de VSV. Ambas proteínas tienen una estructura helicoidal similar (Wu *et al.* 2003). La defosforilación de la proteína N purificada con fosfatasa aumentó su habilidad para encapsidar en la síntesis de RNA *in vitro*. Cuando la proteína N no está fosforilada disminuyen las tasas de transcripción y replicación en el genoma igual que en el virus completo.

El molde para la transcripción y replicación de virus RNA de cadena negativa es una estructura N-RNA, es decir el RNA está asociado a la nucleoproteína viral. Las señales de transcripción serán reconocidas solo cuando el RNA viral está unido a la proteína N. Cuando la proteína N se expresa sola en células eucarióticas se une inespecíficamente a RNAs celulares. En células infectadas por *Rhabdovirus* toda la proteína N se une al RNA genómico y no a RNAm o celulares, esto es porque la fosfoproteína se une como una chaperona a la nucleoproteína y previene así la unión de N a RNAm celular.

Cuando la nucleoproteína N de virus RNA expresada en células de insecto, se une a RNA celular forma un complejo N-RNA como una nucleocápside viral, sin embargo, en células infectadas por virus, la proteína N es prevenida de uniones RNA celular por la formación de un complejo soluble entre la proteína N y la fosfoproteína viral llamado complejo N^o-P. La proteína N solo es liberada de este complejo por unión a un nuevo RNA o un RNA complementario. En un estudio realizado por Mavrakis *et al.* (2003) vieron la co-expresión de

las proteínas N y P virales de rabia en células de insecto y purificaron el complejo N^o-P encontrándolo en forma soluble como N^o-P₂ (Mavrakis *et al.* 2003).

Proteína N recombinante

Dentro de los métodos que permiten la obtención de RNP se encuentra el sistema de baculovirus [patógenos que atacan a los insectos y otros artrópodos] *. Empleando técnicas de biología molecular se puede obtener el gen que codifica para la proteína N del VR el cuál se inserta en el genoma del baculovirus *Autographa californica* nuclear de la polyhedrosis. La expresión del gen recombinante es controlada por el promotor del gen de la polyhedrina. Para obtener a la proteína recombinante el baculovirus se infecta en células de insecto [*Spodoptera frugiperda* (Sf9)] (Wiktor *et al.* 1973; Reid-Sanden *et al.* 1990, Fu *et al.* 1991). La proteína N expresada en células de insecto es antigénica e inmunogénicamente comparable a la RNP del VR y representa una fuente potencial para una vacuna efectiva y económica para la inmunización en humanos y animales contra la rabia (Reid-Sanden *et al.* 1990, Fu *et al.* 1991).

Virus de la rabia como vector

El VR como vector viral en el uso de vacunas tiene varias ventajas: no es patógeno para un amplio número de especies animales si se administra por vía oral o intradérmica, su organización genómica permite modificaciones genéticas fáciles a diferencia de otros genomas complejos de virus DNA y RNA. Los genes extraños que se expresan son estables. Los *Rhabdovirus* tienen un ciclo de replicación citoplásmico y no hay evidencia para recombinación y/o integración en el genoma de la célula huésped. Un vector basado en VR puede ser un inductor en inmunidad a mucosas contra HIV-1. El VR crece con títulos altos en

* <http://www.erc-xford.ac.uk/cohoxford/groups/virusecdogg/bactaxon.htm>

varias líneas de células sin matarlas, lo cual permite la expresión de genes HIV-1 comparados con vectores citoplásmicos. Schnell *et al.* (2000) produjeron un VR recombinante que expresa la proteína gp-160 del VIH, de forma estable y funcional en líneas celulares de linfocitos T humanos. La infección del ratón con este virus recombinante que expresa esta proteína dió una respuesta humoral fuerte, dirigida contra la proteína gp-160 de envoltura VIH-1 después de un reto único con proteína gp120. Los títulos de anticuerpos neutralizantes detectados en el suero del ratón contra VIH-1 estuvieron por arriba de 1:800, estos resultados indican que el VR recombinante vivo que expresa la proteína VIH-1 gp-160 puede servir como un vector efectivo para una vacuna VIH-1.

El VR puede ser usado como vector de expresión para construir un virus recombinante que exprese citocromo C, que es una proteína pro-apoptósica esencial para la actividad proteolítica de Apaf-1 y para la activación de caspasas. Pulmanusahakul *et al.* (2001) demostraron *in vitro* que la expresión del citocromo C en el VR recombinante se asocia con la muerte celular acelerada, e *in vivo* aumenta la inmunogenicidad y atenúa la patogenicidad.

Se conocen 39 genes activados que intervienen en la infección, incluyen genes involucrados en la regulación del metabolismo celular, síntesis proteica, actividad sináptica, crecimiento y diferenciación celular. Prośniak *et al.* (2001) demostraron los efectos de la infección del VR en diferentes patrones de expresión de genes en el cerebro de ratones. Un patrón de fase temprana (tres días después de la infección) y un patrón de fase tardía (6-7 días de la infección) que se asocia con el pico de replicación de VR. Los resultados sugieren que genes del huésped pueden estar involucrados en la replicación y amplificación del VR en el cerebro.

En un estudio realizado por Loza-Rubio *et al.* (2003) se utilizó la proteína N recombinante para detectar el ARNm de IL-2 en linfocitos de pollos inmunizados, para lo cual se vacunaron

animales con una vacuna inactiva contra la influenza aviar adicionando la proteína N recombinante del VR. Los resultados mostraron un incremento de la expresión de IL-2 en los animales inmunizados cuando se compararon con animales controles

La proteína N en el diagnóstico de la rabia

La proteína N se produce primero y en grandes cantidades, por ello es muy importante para la detección del antígeno de la rabia. El CDC (Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, Georgia) para el diagnóstico de la rabia utiliza el gen de la proteína N para pruebas de PCR y formación de oligodendogramas (de Mattos *et al.* 1996, de Mattos *et al.* 1999).

Todas las determinaciones y la tipificación genética de los virus de la rabia aislados en el continente Americano y en otras partes del mundo se hace con base a un segmento de 320 pb localizado en la proteína N, en él se basan los diferentes aislados de las distintas especies, vectores y sitios geográficos (de Mattos *et al.* 1990).

La prueba de anticuerpos fluorescentes (Conos y Kaplan 1950), es muy útil en el diagnóstico de la rabia. El material utilizado puede ser fresco o congelado. Un anticuerpo marcado con el fluorocromo (isotiocianato de fluoresceína), se incuba con el tejido para que reaccione con el antígeno específico (proteína N), si el antígeno está presente habrá partículas fluorescentes.

Otra prueba para la detección de antígeno de rabia es por inmunodiagnóstico enzimático llamada RREID. Es un método altamente sensible y específico. Se extrae el antígeno de nucleocápside de células infectadas con el VR y se purifica por un gradiente de cloruro de cesio (CsCl). Los antígenos virales se emulsifican con adyuvante de Freund y se inoculan intramuscularmente en conejos. Se purifican los anticuerpos IgG anti-nucleocápside de rabia por cromatografía y se adsorben en la fase sólida, la incubación de una muestra positiva con la IgGs se revela con un conjugado a peroxidasa anti-conejo, aparece un color amarillo después

de adicionar el substrato y el cromógeno (o-fenilendiamino). Se evalúa cuantitativamente en un espectrofotómetro (Meslin *et al.* 1996).

HIPÓTESIS

La proteína N del virus de la rabia a similitud del FILM inhibe el proceso inflamatorio, ya que la secuencia de aminoácidos del FILM se encuentra inscrita con un 80% de homología.

OBJETIVOS

Generales

Estudiar si la proteína N del virus de la rabia o un fragmento de la misma que presenta analogía con el FILM posee propiedades anti-inflamatorias comparables a las del FILM.

Específicos

- Establecer si la proteína N del virus de la rabia al igual que el FILM interfiere en las pruebas de: Estallido respiratorio, Locomoción celular e Inhibición de hipersensibilidad retardada cutánea al DNCB.
- Establecer las diferencias entre la función del FILM y la de la región análoga de la proteína N del virus de la rabia y observar si existe relación entre estas y los niveles de actividad anti-inflamatoria.

MATERIAL Y METODOS

Obtención de Nucleocápside a partir de células infectadas con el Virus de la Rabia

Se infectaron 32 botellas que contenían la línea celular BHK-21 con capa confluyente, con 10 ml de la cepa PV* 1:10 (Virus Pasteur 10⁶DICC50) se incubaron por 48 h a 37 °C, y el sobrenadante se eliminó de cada botella, las células se lavaron dos veces con 10 ml de solución salina de fosfatos (SSF) en condiciones de esterilidad y se colocaron en tubos de centrifuga de 50 ml, se adicionaron 10 ml más de SSF y se centrifugaron a 400 g por 15 min a 4°C. Se repitió el procedimiento al sedimento celular. La pastilla se sometió a un choque hipotónico con 4 ml de agua estéril fría durante 10 min a 4°C, las células se maceraron en un mortero de Tenbroke en baño de hielo. El macerado se lavó dos veces con agua estéril fría y se centrifugó a 200 g por 10 min a 4°C, guardando el sobrenadante de cada lavada y reconstituyendo con 1 ml de agua destilada estéril. Se hizo una mezcla con los dos sobrenadantes y se centrifugaron a 5000 g por 10 min a 4°C. Finalmente se cosechó el sobrenadante que corresponde a la NC (Sokol, 1973).

Purificación de NC por HPLC

La NC se purificó por Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC), se usó una Columna de exclusión UltraSpherogelTM SEC 3000 Beckman, con una Fase móvil de KH₂PO₄ y Na₂SO₄ 100mM, Velocidad de flujo: 1 ml/min durante 60 min.

Purificación de NC con CsCl

La suspensión de NC se centrifugó a 200 g por 10 min, al sobrenadante se le adicionó MgSO₄ 5 x 10⁻³M y 20 µl/ml de DNAasa por 30 min a 20°C. A 4.5 ml del sobrenadante se le

adicionaron 4g de CsCl y se centrifugó a 150 000 g por 24 h a 4°C, se colectaron 17 fracciones de cada centrifugado.

Las fracciones obtenidas se dializaron en una membrana de celulosa de corte mayor a 12 kD (Sigma, Chemical Co., St. Louis, MO) con 4 cambios de solución amortiguadora NT (NaCl 0.13M y Tris-clorhidrato 0.05M pH= 7.8).

La concentración de proteína obtenida en cada purificación de NC fue determinada por el método de Bradford (Bradford, 1976).

Pruebas Biológicas

a) Estallido respiratorio (actividad de la NC)

Se obtuvieron los fagocitos mononucleares (FM) a partir de muestras de 40 ml de sangre heparinizada (10 unidades de heparina de sodio/ml de sangre) de adultos jóvenes, sanos y no fumadores (donadas por el Banco de Sangre del Centro Médico Nacional SXXI). Las células mononucleares fueron aisladas por centrifugación sobre Ficoll Hypaque® por el método de Böyum (Böyum, 1968). Sobre 5 ml de Ficoll-Hypaque con una densidad de 1.077 g/ml se colocaron 10 ml de sangre diluida 1:1 (v/v) en SSF en tubos de poliestireno (Falcon, Oxnard, CA). Se centrifugaron a 400 g por 40 min a 20°C, al cabo de los cuáles, las células de la interfase se recogieron, se lavaron 3 veces con SSF.

Los FM (20 µl) se colocaron en pozos de poliestireno oscuros (black combiplate 8, Labsystems) de 300 µl, con 20 µl de proteína N o SSF y se incubaron por 15 min a 37°C, a la reacción se agregaron 210 µl de luminol ($1 \times 10^{-6}M$) (Eastman Kodak, Rochester, NY) y 60 µl de zimosán opsonizado (ZO) 12.5 mg/ml. La intensidad luminosa de cada uno de los pozos se midió por 45 min en un equipo Luminómetro Labsystems Luminoskan RS, los resultados

fueron registrados en unidades relativas de luz y expresados como la máxima intensidad luminosa a un tiempo dado.

b) Bloqueo de la NC con un Ab anti-NC

Se tomaron 20 μ l de FM (1×10^6 /ml) y se les adicionó 10 μ l de NC y 10 μ l de anticuerpo anti NC (1:100), se incubó por 30 min a 37°C, posteriormente se adicionaron 210 μ l de luminol y 60 μ l de zimosan opsonizado. La respuesta se midió durante 45 min en un equipo Labsystems Luminoskan RS, los resultados se registraron en unidades relativas de luz y expresados como la máxima intensidad luminosa.

Obtención de la proteína N recombinante

Para obtener el RNA del virus de la rabia dos ratones lactantes se infectaron por vía I.C. con 0.03 ml de una suspensión de virus de rabia con aproximadamente 100LD₅₀. A los 4 días de infectados, se sacrificaron, se extrajo el cerebro y se colocó en hielo. El tejido cerebral infectado se pesó en fracciones de 7, 14 y 21 mg y se colocaron en tubos eppendorf se les adicionó 1ml de reactivo de Trizol® (Gibco Laboratories, Life Technologies, Inc., Grand Island, N.Y), como describió Chomczynski et al. 1987, se les pasó por jeringa de insulina para disgregar el tejido, se les adicionó 0.2 ml de cloroformo 100%, se les agitó vigorosamente por 2 min y centrifugó por 15 min a 5500 g a 4°C. La fase acuosa fue recuperada y mezclada con 0.5 ml de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1, se centrifugó a 5500 g por 15 min a 4°C. Nuevamente a la fase acuosa se le adicionó 0.5 ml de alcohol isopropílico frío al 100% y se mezcló por inversión e incubó 30 min a -20°C. Se centrifugó por 15 min a 5500 g a 4°C, las pastillas se lavaron con 0.5 ml de etanol frío 75%, se les agitó y centrifugó a 3500 g por 10 min a 4°C. El etanol se eliminó por evaporación. La concentración de RNA obtenida se cuantificó en un espectrofotómetro a 260 y 280 nm de longitud de onda.

Integridad del RNA. - Se pesaron 0.3 g de agarosa y se adicionaron 17 μ l de agua DEPC, 2 ml de MOPS 10x, 1 ml de formaldehído al 37%. La mezcla disuelta se aplicó en una cámara de electroforesis. La muestra de RNA se preparó con 20 μ l de RNA y 10 μ l de amortiguador de muestra, se desnaturalizó a 65°C por 10 min y se colocó en el gel que se corrió a 40 volts por 5 min, y después 60 volts por 1 h se visualizó bajo luz U.V.

Obtención de DNA

Conociendo la secuencia completa de la proteína N en el GenBank No. de acceso:M13215 *

Se sintetizaron los iniciadores frontal y posterior:

Primer frontal : (5' a 3')CGG GAT CCG ATG GAT GCC GAC AAG ATT GCC

Primer posterior: (5' a 3')CGG GAT CCT TAT GAG TCA CTC GAA TAT GTC

RT-PCR.- Se tomaron 1.4 μ l del primer BACNR (250 ng/ml) 1:10, 2 μ g de RNA, 1 μ l de dNTPs 10 mM, 12 μ l de agua DEPC, se incubó por 5 min a 65°C, y 5 min a 4°C, posteriormente se adicionaron 4 μ l de buffer para síntesis de cDNA 5x, 1 μ l DTT 0.1M y 1 μ l RNAsa OUT® 40 U/ μ l , se incubó programando el termociclador a: 42 °C/2 min, se adicionó 1 μ l RT (Termo Script®)(Invitrogen) se incubó a 42°C/50 min y 70°C/15 min.

Obtención de condiciones de temperatura para amplificación del gen de la proteína N

PCR.-Con el objeto de amplificar el gen que codifica para la pN, se procedió a realizar un gradiente de temperatura de la PCR para el cDNA obtenido con los primers diseñados y así poder definir las condiciones óptimas de trabajo.

Se mezclaron 4 μ l cDNA, 2 μ l dNTPs 10 mM, 1 μ l de BACNF (0.5M) y 1 μ l primer BACNR (0.5M), 1 μ l BSA, 1 μ l Triton 2%, 2 μ l buffer 10x, *Taq* (0.125U/ μ l)0.5 μ l con 8.5ml

*[www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/blast/nhp_blast](http://www.ncbi.nlm.nih.nih.gov/cgi-bin/blast/nhp_blast) 2004

agua. En un termociclador Techne ftgene 2D, se efectuó una desnaturalización a 94°C/3 min, 94°C/30 seg, una alineación de 55-70°C (55.1, 59.4, 63.3, 67.6, 70.2°C) y una extensión a 72°C/1 min, 72°C/3 min.

Integridad del DNA- Agarosa al 1%, en 100 ml de TBE y bromuro de etidio 0.5 µg/ml, se adicionaron a la cámara de electroforesis en peines de 10 pozos, después que solidificó el gel se colocaron 10 µl del marcador de DNA (λ DNA BsTE II Digest) en los extremos del gel y en los pozos centrales las muestras, se adicionó TBE 1x, se cerró la cámara de electroforesis y se corrió a 105 volts por 30 min. El gel se pasó a un transiluminador para ver integridad del material génico.

Purificación del producto de PCR

Del gel obtenido por electroforesis se cortó la banda de interés se colocó en microtubos, se adicionaron tres volúmenes de NaI 6 M, se mezclaron e incubaron a 55°C hasta fundir el gel, se adicionaron 12 µl de perlas de silica cubriéndolas de la luz, se mezclaron en vortex y se incubaron en hielo por 2 h, se centrifugaron a 15000 g por 5 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó dos veces con solución New wash (NaCl, Tris, EDTA, etanol) se quitó el sobrenadante y evaporó por 10 min a 55°C, se reconstituyó en 20 µl de agua, se mezcló e incubó por 10 min a 55°C y se centrifugó a 11000 g por 5 min, se cuantificó el contenido de DNA en el sobrenadante y se realizó electroforesis en agarosa al 1% en las condiciones ya descritas.

Ligacion del gen pN con el plásmido pUC-19

Con el propósito de introducir el gen de la pN en el plásmido pUC-19 y promover su replicación se realizó lo siguiente: del gen obtenido de la pN se tomaron 4 ng se adicionó 2.5

μl de pUC19/smaI/TA 100 ng/ μl , 1 μl T4 DNA ligasa 1U/ μl , 2 μl de amortiguador de ligación 1x, 1.2 μl PEG 2.5% y 9.3 μl de agua DEPC, se incubó por 16 h a 4°C.

Transformación Bacteriana

A 100 μl de células competentes DH10b se adicionaron 8 μl (40 ng/ μl) del tubo que contiene el gen pN unido al pUC19 (reacción de ligación), se incubaron en hielo por 30 min y 42°C por 1 min, se adicionó 1 ml de medio Luria Broth (LB) (Gibco Laboratories, Life Technologies, Inc., Grand Island, N.Y) se incubó por 45 min a 37°C y se sembraron cajas de petri con medio LB, ampicilina 25 $\mu\text{g/ml}$ y Xgal IPTG 2.5% se incubaron por 24 h a 37°C. Se seleccionaron las clonas blancas, se resembraron en medio LB.

Orientación usando un primer universal y uno específico para la proteína N

Para verificar que el inserto del gen de la pN estuvo correctamente orientado se realizaron las siguientes pruebas: simultáneamente en tubos de PCR se adicionó:

Para el *primer específico*: 5 μl DNA pN, 2 μl de dNTPs 10 mM, 1 μl BACNF y R (0.5 μM), 1 μl BSA, 1 μl Triton 2%, 2 μl buffer C 10x, 0.5 μl *Taq*, 7.5 μl de agua DEPC (Gibco Laboratories, Life Technologies, Inc., Grand Island, N.Y).

Para el *primer universal M13*: 5 μl DNA, 2 μl dNTPs 10 mM, 0.4 μl M13, 2 μl buffer C 10x, 0.8 μl de *Taq* (0.125), 9.8 μl agua.

Condiciones del termociclador Techne figne 2D para ambos primers 94°C/3', 94°C/30'', 55°C/30'', 72°C/ 90'y 72°C 3'. Se realizó la electroforesis en las condiciones ya descritas.

Se seleccionaron y cultivaron las clonas que fueron positivas para ambos primers.

Obtención de clonas con inserto “minipreparación en medio líquido LB ”

Las colonias de interés, se sembraron en 5 ml de LB (Gibco Laboratories, Life Technologies, Inc., Grand Island, N.Y), con 5 μ l ampicilina (25 μ g/ml) en agitación por 15 h a 37°C. El cultivo se centrifugó a 2500 g por 15min, para eliminar el sobrenadante. La pastilla se resuspendió con 200 μ l de solución de lisis (8 % de sacarosa, 5 % de Triton X-100, 50 mM de EDTA y 50 mM de Tris pH 8) y se incubó 10 min a 20°C. Posteriormente se adicionaron 1.25 μ g/ μ l de lisozima, se incubó 10 min a 20°C. La muestra se llevó a 95°C en baño maría por 1 min y se centrifugó a 11000 g por 10 min. El sobrenadante se recuperó y se adicionaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se incubó a -70°C/30 min y se centrifugó a 15000 g por 10 min, se lavó con etanol al 70% a 1500 g por 5 min dos veces y se desechó el sobrenadante. La pastilla se secó por centrifugación al vacío durante 5 min y se resuspendió en agua destilada estéril. Se realizó la electroforesis en las condiciones ya descritas.

Se usó un espectrofotómetro para cuantificar el DNA, como se describió anteriormente.

Corte con BAMHI para la liberación del DNA

El DNA genómico de la pN que está insertado en el pUC19 se digirió con la enzima de restricción BamHI. Se tomaron 26.4 μ l de DNA (189 ng/ μ l), 1 μ l de enzima BamHI (20 U/ μ l), 10 μ l de buffer de enzima 1x, 1 μ l BSA 1x, 1 μ l de espermidina 1 mM, la reacción se llevó a un volumen final de 100 μ l con agua DEPC y se incubó por 16 h a 37°C. Para determinar si el DNA genómico se encontraba completamente digerido, las muestras se evaluaron por electroforesis. Posteriormente se purificó el fragmento de la pN y se evaluó también por electroforesis, como se describió previamente.

Ligación del gen pN a un pFAST-BAC HTA/BAMH1/FAC

Ligar el DNA de la pN a otro vector el pFast-Bac HTa/BamH1/FAC que es el sistema de expresión en baculovirus (Sistema Comercial BAC-TO-BAC® (Gibco BRL), el cuál por transposición sitio específica, genera un bácmido recombinante que al ser transfectado en células de insecto origina al baculovirus recombinante que expresa en ayuda del promotor de la poliedrina, al gen recombinante que codifica para la proteína N. Se realizó la siguiente reacción: 1.3 µl del DNA de la pN (26.8 ng), 3 µl del vector (100 ng/µl), 1 µl T4 ligasa (1U/ml), 2 µl amortiguador de ligación 1x, 1.2 µl PEG (2.5%), 2µl BSA 1x, 9.5 µl agua (vol. final de reacción de 20 µl) se incubó por 24 h a 4°C. La orientación de las clonas usando una combinación de primers específico y del pFast-Bac. El producto de PCR obtenido se filtró en columnas de Sephadex G50, se centrifugó a 2700 g por 3 min. Las muestras se secaron por centrifugación al vacío por 45 min, se protegieron de la luz y se congelaron para su secuenciación.

Otra forma de verificar la orientación es por la secuencia de la proteína con el kit DNA sequencing kit big dye (Applied Biosystems Foster City, CA) en un termociclador Techne con las siguientes condiciones: a 1.5 µl ADN (150 ng) se adicionaron 1.6 µl de iniciador (3.2 pM/rx), 4 µl de amortiguador de reacción, se incubó por 10 seg a 90°C, 5 seg a 50°C, 4 min a 60°C.

Alineación de identidad

Se realizó una alineación de identidad (blast) en el banco de genes (gene bank), para saber si el gen clonado correspondía a la pN. Se tomó el DNA para realizar la transposición en células competentes DH10BAC.

Transposición en células competentes DH10BAC

Se procede a transponer el DNA de la proteína N ya en el sistema de baculovirus, en células competentes.

A 100 µl de células competentes DH10BAC se le agregaron 40 ng del plásmido recombinante, se mezclaron e incubaron en hielo por 30 min. La mezcla se expuso a un choque térmico por 1 min a 42°C, se enfrió por 2 min a 4°C. Se les adicionó 900 µl de medio SOC (Gibco Laboratories, Life Technologies, Inc., Grand Island, N.Y). Los tubos se incubaron en agitación por 4 h a 37°C. Se realizaron diluciones de las células con el medio SOC 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} . Se sembraron 100 µl de cada dilución en placas de agar Luria Broth con 50 µg/ml de kanamicina, 7 µg/ml de gentamicina, 10 µg/ml de tetraciclina, 200 µg/ml de blue-gal, 200 µg/ml de IPTG. Las placas fueron incubadas 48 h a 37°C.

Aislamiento del DNA del b́acmido recombinante

De las colonias blancas con el b́acmido recombinante se obtuvo el DNA.

Para obtener a la pN recombinante fue necesario cultivar células de insecto Sf9 para posteriormente realizar la transfección e infección.

Cultivo de células de insecto de *Spodoptera frugiperda* (SF9)

En una botella de cultivo de 25 ml de capacidad se pusieron 5 ml de células Sf9 (10^6 /ml) (Gibco Laboratories, Life Technologies, Inc., Grand Island, N.Y) con 20 ml de medio Sf-900 II suplementado con suero fetal bovino (SFB) 10%, glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomycin 100 µg/ml, gentamicina 2 mg/100ml y piruvato de sodio 100 mM (Medio completo). Se incubó por 48 h a 26°C, posteriormente se revisaron en microscopio de luz invertido con objetivo 40x al visualizar que la capa confluyente ya estuvieran listas para expandir a otras cajas de cultivo (Mavrakis *et al.* 2003).

Transfección en células de insecto SF9

Las células SF9 se sembraron a una concentración 9×10^5 en 1 ml de medio incompleto Sf-900 II en placas de 6 pozos. Se incubaron por 60 min a 27°C para permitir su adherencia. Para cada transfección se utilizaron dos soluciones: la solución (A) 1 µg del ADN del báculo en 100 µl de medio Sf-900 II incompleto. Y la solución (B) 6 µl de cellfectin (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) en 100 µl de medio Sf-900 II incompleto. Las soluciones A y B se mezclaron e incubaron por 45 min a 20°C. Las células se lavaron con 1ml de medio Sf-900 II incompleto. Para cada transfección se agregó 200 µl de A+B y 800 µl de medio Sf-900 II sin antibiótico, se mezcló y colocó sobre las células. La mezcla fue incubada por 5 h a 27°C, posteriormente se agregó 1 ml de medio Sf-900 II completo. Finalmente se incubó por 6 días a 27°C.

Para demostrar que se tuvo a la pN recombinante en las células de insecto se llevó a cabo la prueba de inmunofluorescencia, usando un Ab anti-NC.

Detección de la pN recombinante por Inmunofluorescencia

La suspensión de células infectadas se centrifugó a 1500 g por 10 min, se tiró el sobrenadante y a la pastilla se le adicionó 0.1 ml de un anticuerpo de conejo anti-NC conjugado con fluoresceína, 0.1 ml de SSF 2x, se resuspendió el botón y se incubó por 30 min a 37°C se centrifugó a 230 g por 10 min, se tiró el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 40 µl de solución (SSF 1x, azida de sodio 0.1 %, SFB 2%, EDTA 5 mM). Finalmente se puso en una laminilla la cual se leyó en un microscopio de fluorescencia a 40x.

Una vez demostrado la presencia del gen de pN, se procede a infectar más células de insecto para obtener una buena cosecha de esta proteína.

Infección de células de insecto

La infección se llevó a cabo en 5 cajas con células confluentes se les quitó el sobrenadante y se les adicionó 3 ml del sobrenadante del 6° día de transfección a una dilución 1:5. Se incubaron por 1h a 26°C agitando cada 10 min. Se desechó el sobrenadante y se adicionó a cada botella 10 ml de medio Sf-900II completo, y se incubó por 3 días a 26°C.

Cosecha de la proteína N

Las células se despegaron con un gendarme. Para obtener un estimado del peso de la cosecha se pasaron a un tubo de 50 ml estéril previamente pesado, se mezclaron (se tomó una alícuota de 1 ml para su prueba por inmunofluorescencia (IF)), se centrifugaron a 200 g por 5 min, se tiró el sobrenadante y a la pastilla se le adicionó 0.85 ml de solución de lisis (Tris-HCl 50mM, 2-mercaptoetanol 5mM, KCl 100mM, PMSF 1mM, nonidet P-40 1%), se mezcló y sonicó por 15 min, se pasó a tubos eppendorf y se centrifugó a 15000 g por 10min. El sobrenadante se almacenó a -70°C para su purificación.

Purificación de la proteína N en base a su cola de histidinas (proteína de fusión)

La proteína de fusión resultante presenta una cola de histidinas, útil para su purificación, por medio de una columna de Ni-NTA por la cual tiene afinidad.

El sobrenadante de las células de insecto infectadas y lisadas se filtró con membranas de 6 µm y se purificó en un equipo *AKTA*prime en el que se puso una columna de afinidad para Ni-NTA. La columna usada fue de 5 ml HiTrap® Chelating, asa de 5 ml, volumen de muestra 5ml (0.5 ml de SN + 4.5 ml de buffer de unión), longitud de onda programada 280 nm. Se prepararon tres amortiguadores: amortiguador de unión (fosfato de sodio 20 mM + NaCl 0.5M, pH 7.4), amortiguador de elución de carga de Ni (NiSO₄ 100 mM en agua destilada) y un amortiguador de elución (fosfato de sodio 20 mM +NaCl 0.5 M + imidazol 0.5 M, pH 7.4).

El eluyente de lavado fue agua destilada. Las condiciones de trabajo: 0-25 volúmenes 100%B, flujo 40 ml/min, 25-166 volúmenes 0%B y flujo de 1 ml/min, 196-213 volúmenes 100%B flujo de 1ml/min, 213-228 volúmenes flujo de 40 ml/min y 1ml/min. Con estas condiciones se inicia el proceso programado y se colectaron 44 fracciones de 1 ml cada una. Se seleccionaron las alícuotas que correspondieron a la proteína de fusión. Este procedimiento se realizó por triplicado siguiendo las instrucciones de Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden.

Desalado de la proteína N purificada

Para eliminar el exceso de imidazol se utilizó un equipo *ÄKTA*prime con una columna de desalado de 5 ml HiTrap® Desalting, asa de 5 ml, volumen de muestra de 5 ml, longitud de onda de 280 nm, amortiguador de elución: fosfato de sodio 20 mM + NaCl 0.15 M, pH 7.0 las condiciones del método fueron: 35 volúmenes 100%A, flujo de 5 ml/min, 60-75 volúmenes 100%A, flujo de 5 ml/min. Se corrió el método y se tomaron 15 fracciones de 1 ml cada una. Se seleccionaron las alícuotas que correspondieron a la proteína sin imidazol. Este procedimiento se realizó por triplicado siguiendo las instrucciones de Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden. Finalmente para quitar el exceso de sales se dializó la pN en una membrana de celulosa con 5 cambios de agua grado HPLC. La muestra se liofilizó en un equipo HETO *FD 2.5* (HETO Lab. Equipment).

Caracterización de la proteína N recombinante por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras.

Gel concentrador se preparó una mezcla: 0.625 ml de acrilamida-bisacrilamida (30:0.8) + 1.25 ml de amortiguador de preseparación + 0.5 ml SDS 10% + 0.25 ml de persulfato de amonio 1.5% + 2.825 ml de agua destilada + 0.01 ml de TEMED.

Gel de separación se preparó una mezcla de 5 ml de acrilamida-bisacrilamida(30:0.8) + 1.85 ml amortiguador de separación + 0.150 ml SDS 10% + 0.750 ml persulfato de amonio 1.5% + 7.225 ml agua destilada + 0.0075 ml de TEMED.

Amortiguador de corrida: Tris 0.25M, glicina 1.92 M (pH 8.3) + 30.3 g Tris + 144 g glicina en 1000 ml de agua.

Se prepararon 1000 ml de amortiguador de corrimiento: solución de corrida + SDS 10% + agua destilada.

Se montó la cámara de electroforesis con un peine de 10 pozos para cada gel.

Preparación de la muestra: amortiguador de muestra: 4.8 ml de agua + 1.2 ml Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 + 1.0 ml glicerol + 2.0 ml SDS 10% + 0.5 ml azul de bromofenol 0.1%. Muestra: 25 μ l β -mercaptoetanol + 475 μ l de amortiguador de muestra.

Aplicación de la muestra: 15 μ l muestra + 15 μ l de amortiguador de muestra, se hirvió y aplicaron 20 μ l a cada pozo.

Se cerró la cámara de electroforesis después de adicionar el amortiguador de corrida y aplicar 80v por 1.5 h.

Tinción del gel: azul de coomasie 0.4 % + ácido acético 12% + etanol 20%, se tiñó por 15 min a 55°C, se tiró la solución y lavó con agua. Para desteñir se usó: metanol 4% + ácido acético glacial 20%, se lavó con solución de desteñido hasta que se observaran las bandas.

Especificidad de la pN purificada con su anticuerpo (Dot Blot)

Es importante verificar si las fracciones obtenidas corresponden a la pN estudiada, es decir ver la especificidad, realizando dot blot.

Se cortó una membrana de nitrocelulosa de 3x10 cm. Se aplicaron 25 μ l gota a gota de la muestra problema, o de los controles positivo (NC) o negativo (SSF, H₂O) hasta que las

manchas se secan. La banda de nitrocelulosa se bloqueó con SSF-Albúmina bovina 3% por 2 h a 37°C con agitación. Se lavó 4 veces con SSF-tween por 5 min a 37°C y una vez con SSF. Se adicionó un anticuerpo anti NC 1:25 (Laboratorios Baer, México D.F.) se incubó por 5 min a 37°C, se continuó la incubación toda la noche a 4°C con agitación. Se lavó 4 veces con SSF-tween por 5 min a 37°C y una vez con SSF se adicionó un anticuerpo anti conejo unido a peroxidasa (1:800) en SSF-Albúmina bovina 3%, se incubó por 30 min a 37°C y por 30 min a 20°C. Se lavó 4 veces con SSF-tween por 5 min a 37°C en agitación y una vez con SSF. Se reveló con diamino bencidina + peróxido de hidrógeno 30% con SSF.

Caracterización Biológica de la proteína recombinante:

a) Estallido respiratorio b) Locomoción celular c) Hipersensibilidad retardada cutánea

Estallido respiratorio se realizó como se describió previamente.

Locomoción celular Se utilizó suero activado por zimosán (SAZ), como atrayente celular. El SAZ induce la formación de C5a que en su forma C5a des-arginina es un poderoso atrayente para los FM (Ward, 1968). El SAZ se preparó el día previo al ensayo con suero humano fresco de donadores adultos sanos con sangre de tipo AB Rh+, el cual se almacenó en alícuotas de 2 ml a -70°C hasta su uso. Se activó con 4 mg de zimosán por ml de suero. El zimosán se eliminó por centrifugación de acuerdo con el método de Ward (1968).

La locomoción de los leucocitos (FM) fue evaluada *in vitro* por duplicado por el método de Snyderman, usando microcámaras de doble filtro (Neuroprobe, Corp., Bethesda, MD). Se utilizó un filtro superior o colador de policarbonato libre de polivinil pirrolidona (PVP) (Nucleopore, Corp. Pleasanton, CA) con tamaño de poro de 5 µm para evaluar la movilidad de FM. El filtro inferior o atrapador utilizado fue de nitrato de celulosa, impermeable a las células, con un tamaño de poro de 8 µm (Sartorius GmbH, Göttingen, Alemania). Se

colocaron 500 000 células (FM) en 0.2 ml medio de Gey-Albúmina (Gey-A) en el compartimento superior de la microcámara y en el compartimento inferior se colocaron 100 µl del medio Gey- A (movilidad aleatoria) ó 20 µl de suero activado con zimosan (SAZ) diluido en 80 µl de medio de Gey-A. El efecto de la pN sobre la locomoción celular (quimiotaxis modificada) se estudió agregando 20 µl de pN al compartimento inferior de la microcámara más 80 µl de la mezcla quimiotáctica para mantener el volumen final de 100 µl. Las cámaras se incubaron por 90 min a 37°C. Después de la incubación, la suspensión celular en el compartimento superior y las soluciones del compartimento inferior fueron desechadas. El filtro atrapador fue fijado en etanol al 80%, teñido con hematoxilina-eosina de Harris y montado sobre laminillas de vidrio, colocando en la cara superior del filtro una gota de resina sintética disuelta en xilol al 60% seguida de un cubreobjeto. La migración de las células a los filtros atrapadores fue evaluada en doble ciego por microscopía de luz a 40x. Se contaron las células recorriendo 2 diámetros perpendiculares en cada filtro (se cuantificó un total de 10 campos por filtro). La locomoción celular fue expresada como el número de células migrantes por campo observados con el objetivo seco fuerte (40x) (Kretschmer *et al.* 1985).

Hipersensibilidad retardada cutánea al DNCB

Preparación de los animales. Los animales de experimentación fueron cobayos machos, albinos Harley (*Cavia perea*) adultos de pelo corto de aproximadamente 350 g de peso. El dorso de los animales fue rasurado y depilado en un área de aproximadamente 6x8 cm (Giménez *et al.* 1997).

Sensibilización. 24 h posteriores al rasurado y depilado de los animales, éstos fueron sensibilizados con una dosis microvesicante (sensibilizante) de DNCB (10 mg/ml en

acetona/aceite de oliva 1:4) impregnando un disco de papel filtro Whatman del número dos de 5 mm de diámetro con 20 µl de esta solución. El disco fue adherido a un parche epicutáneo que se fijó al dorso del animal, y se cubrió toda la parte depilada con gasa afianzándola con tela micropore. Los animales fueron colocados individualmente en inmovilizadores especiales por 24 h, posteriormente se eliminó el parche epicutáneo y se procedió a la lectura de sensibilización (presencia de edema, vesiculación, eritema e induración con un diámetro mínimo de 5x5 mm).

Retó. 14 días después de la sensibilización, se prepararon nuevamente los cobayos para el reto, la parte libre de pelo se dividió en cuatro cuadrantes, en cada uno se inoculó intradérmicamente 0.05 ml de una solución pN a 5, 27 ó 54 µg/ml respectivamente o SSF como testigo negativo de inhibición, discos idénticos a los usados en la sensibilización, fueron colocados sobre las aplicaciones intradérmicas, pero ahora impregnados con 20 ml de una dosis de reto de DNCB diluido 1:200 (doscientas veces menor a la usada en la sensibilización). Los parches epicutáneos fueron sujetos y los animales inmovilizados nuevamente por 24 h, después de lo cual los discos fueron eliminados y se procedió a la lectura de la reacción de hipersensibilidad retardada 48 h posteriores al reto. La lectura positiva (no inhibición de la hipersensibilidad retardada cutánea al DNCB) se caracterizó por la presencia de edema, eritema, induración y visualización de un diámetro de al menos 5x5 mm en la zona de aplicación



Análisis estadístico.

Todos los experimentos fueron analizados mediante la prueba de Fisher para un análisis de varianza, posteriormente, por la prueba no paramétrica U de Mann Whitney (Altman *et al.* 1991, Armitage *et al.* 2002).

RESULTADOS

NC obtenida de la infección de la línea celular BHK-21

Se evaluó el estallido respiratorio producido por la NC sin purificar. Los FM incubados con zimosán opsonizado y SSF presentaron un pico máximo de 0.340 URLs (Fig. 1A), mientras que los FM incubados con la NC sin purificar a una concentración de 6 µg/ml tuvieron un pico máximo de 0.050 URLs (Fig. 1B).

Purificación de la NC con HPLC

La NC obtenida por infección de la línea celular BHK-21 se purificó, obteniéndose 6 picos el tercero con un tiempo de retención de 12 min, que corresponde al pico de la pN (55 kDa) (Fig.2A) comparado con el marcador de peso molecular citocromo C, cuyo tiempo de retención es de 11.48 min (Fig.2B).

Purificación de la NC con CsCl

Al realizar el gradiente de CsCl se obtuvieron 17 fracciones, a cada una se les determinó, concentración de proteína y porcentaje de inhibición del estallido respiratorio, la fracción 7 tuvo 5.2 µg/ml de proteína y una inhibición de 35% del estallido respiratorio (Fig. 3).

Bloqueo de la NC

El estallido respiratorio de FM estimulados y expresado en área bajo la curva fue de 19.37 mm² y cuando se incubaron con NC + ZO el área bajo la curva fue de 3.27 mm². Al incubar los FM con una mezcla de NC y un Anticuerpo anti-NC a una concentración de 1:100, se obtuvo un área bajo la curva de 9.6 mm² (Fig. 4).

Producción de la pN por la técnica del DNA recombinante

Al RNA total obtenido se le verificó su integridad y a partir de este se obtuvo el cDNA. La Figura 5 muestra un gradiente de temperatura que permitió seleccionar la más adecuada, en el extremo izquierdo se muestra el marcador λ , a 1300pb se localiza la pN. Los mejores resultados se observaron a 68°C. Se purificó el fragmento del gen de la pN por electroelución con NaI de los productos de PCR (Fig. 6). Una vez obtenido el gen de la pN se ligó a un plásmido pUC-19, el cual se incorporó en células competentes DH10b con las que se seleccionaron 23 clonas recombinantes. Con un primer universal (Fig. 7) y otro específico (Fig. 8) para el fragmento del gen de la pN se probó orientación, sólo se amplificaron 9 clonas con ambos primers (Fig. 9). Las 9 clonas fueron digeridas con BamHI y se obtuvieron 5 fragmentos de DNA insertados de las clonas 4, 6, 15, 16, 21 (Fig. 9). Se purificó nuevamente y se electroeluyó (Fig. 10).

Se ligó el inserto de la pN al baculovirus, usando el cDNA, una ligasa y el pFast-Bac Hta.

Se obtuvieron 39 clonas transformadas en células *E. coli*, se amplificaron para ver su orientación (Fig. 11a, 11b). Cuatro de las 11 clonas resultaron bien orientadas, dos se secuenciaron, encontrándose correspondencia con la secuencia reportada en el Gen Bank para la proteína, también se observó una pureza adecuada (Fig. 12).

La presencia de la pN se probó por inmunofluorescencia con los sobrenadantes de los días 3, 6, 9 y 12 posteriores a la transfección. Las células fluorescentes corresponden a las que produjeron partículas virales con el inserto de la pN (Fig. 13).

Se confirmó también la presencia de la pN en el sobrenadante de las células infectadas con virus recombinante por electroforesis, ya que la banda observada de la pN se encontró en la región de 55 kDa.

Purificación de la pN por cromatografía de afinidad

Mediante esta purificación se obtuvieron 43 fracciones, de la 27 a la 43 (Fig. 14) se valoró la presencia de proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras. Las bandas que correspondieron a la pN estuvieron en la zona 55 kDa .

Dot blot

La especificidad de la pN se realizó en las fracciones 27, 28, 29 mediante dot blot el cual resultó positivo (Fig. 15).

Las fracciones obtenidas en la cromatografía se mezclaron y se pasaron por una columna de intercambio iónico, se dializaron se liofilizaron y se reconstituyó con agua destilada la pN recombinante. Se probaron tres diferentes lotes de pN (Fig. 16).

Pruebas Biológicas “ *in vivo e in vitro* ”

Efecto de la pN sobre el Estallido respiratorio

La pre-exposición de FM a la pN causó una inhibición del 43% en la quimioluminiscencia generada mediante el desafío con zimosan opsonizado ($p < 0.05$) y medida como pico máximo generado a los 10 min al compararse con el control (Fig. 17).

Efecto de la pN sobre la locomoción celular de FM

Usando SAZ como quimioattractante se observó un aumento significativo de la quimiotaxis en FM al compararse con el control (movilidad al azar) ($p < 0.05$). La pN no inhibió la quimiotaxis de los FM, pero es capaz de estimular la quimiotaxis de los FM tanto como

lo hace el SAZ que se considera un estándar de oro para esta estirpe celular $p < 0.05$ (Fig. 17-18).

Pruebas de hipersensibilidad retardada cutánea

Las lecturas se tomaron a las 48 h. Se consideraron positivas aquellas reacciones con edema, eritema, induración con al menos un tamaño de 5x5 mm como línea de corte. En la Figura 19, se observa la sensibilización al DNCB de dos cobayos. En las tres concentraciones de proteína N usadas para el reto (5, 27 y 54 $\mu\text{g/ml}$) puede verse la relación inversa que se obtuvo: a menor concentración mayor zona de eritema (Fig. 20). La Figura 21 muestra el efecto de la proteína N sobre la hipersensibilidad retardada cutánea (induración) producida por el DNCB misma que resultó no inhibitoria a las concentraciones probadas, los valores obtenidos no fueron significativos al compararse con el control ($p > 0.05$).

DISCUSION

La inflamación es un fenómeno biológico en el que se involucran una serie de mediadores que conllevan a una reacción inflamatoria aguda (Schistosomiasis, Leishmaniasis) como en los estados tempranos de la invasión a tejidos, sin embargo, en ciertos casos como en el absceso hepático amibiano y la rabia los eventos inflamatorios son atípicos. El análisis estructural de la reacción inflamatoria presente en periodos tempranos de la infección hepática amibiana, ha confirmado que la lisis de PMNs juega un papel importante en el desarrollo inicial del absceso hepático amibiano. Los macrófagos juegan un papel relevante en la extensión del absceso después de que la necrosis es iniciada por la destrucción de células inflamatorias (Tsutsumi y Martínez-Palomo 1988). En la rabia hay severo daño neurológico, con un mínimo de células inflamatorias. Existen reportes que sugieren que en ratones con rabia experimental la destrucción de tejido parenquimatoso, se debe a la respuesta humoral y celular del huésped (Iwasaki *et al.* 1977).

La proteína N del VR tiene varias funciones, es la primera que se sintetiza y en grandes cantidades es por ello muy importante para la detección del antígeno de la rabia, además de ser la proteína mas conservada antigénicamente entre las diferentes cepas del VR.

La proteína N juega un papel importante en la patogénesis de la rabia, hay factores inmunológicos que modulan la respuesta a esta proteína.

En la infección, los macrófagos forman parte de la primera línea de defensa y su función depende de interacciones específicas del receptor y el ligando.

La pre-exposición de FM con el FILM causó una inhibición del Estallido respiratorio y una total cancelación de la quimiolumiscencia con zimozan opsonizado (Kretschmer *et al.* 2001).

Por otro lado, la proteína N también inhibe el estallido respiratorio de FM, activados por zimosan opzonizado. Esta inhibición puede ser debido al bloqueo de los receptores CD14, los cuales son importantes para su respuesta, o para el componente de traslocación asociado con el citocromo b_{558} . Hay reportes (*Bordetella pertussis*) donde hay inhibición del ER por AMPc (Klein, 1997), sin embargo, esta inhibición no es debido a los cuatro aminoácidos que comparte la proteína N con el FILM, ya que un construido sintético (Met-Gln-Cis-Asn) no causó inhibición (manuscrito en preparación). El efecto inhibitor podría ser debido a la proteína N completa.

La proteína N estimuló la locomoción celular de FM, esto hace suponer que esta proteína actúa como un agente activador de la proteína cinasa C y se comporta como un éster de forbol o como ionóforo de calcio. Los receptores en los FM para quimiotaxis están asociados a proteína G y activan vías de señalización intracelular. Por otro lado, también se ha reportado el efecto adyuvante de la proteína N, así como su capacidad de inducir una respuesta inmune celular. Mientras que el FILM inhibió la quimiotaxis de los FM hacia el SAZ (40%).

Se sintetizó un tetrapéptido (Met-Gln-Cis-Asn) que corresponde a los cuatro aminoácidos que homologan con el fragmento de la proteína N, y se hicieron pruebas de hipersensibilidad retardada cutánea en cobayos y estallido respiratorio en FM, en donde se vió una respuesta biológica diferente a la producida por la proteína N recombinante, por otro lado, un estudio teórico de la estructura electrónica y geométrica del FILM destaca la presencia de un grupo farmacóforo en la secuencia del pentapéptido (Met-Gln-Cis-Asn-Ser), el cual podría ser imprescindible y de gran importancia en estos péptidos (ya que el grupo farmacóforo es esencial para la actividad anti-inflamatoria). Los métodos *ab initio* que identifican la estructura química espacial y los sitios reactivos más probables en la molécula, apuntan que el

segmento ...Cis-Asn-Ser constituye la porción crítica funcional del FILM. Se probaron tres tripéptidos para demostrar la actividad del grupo farmacóforo y los resultados están evaluándose. Nuestros resultados podrían sugerir que la secuencia de 4 aminoácidos presentes en el FILM y que se encuentran en la proteína N podrían estar no expuestos en la estructura secundaria de la proteína, y por lo tanto no tener el efecto biológico buscado.

La pN a diferencia del FILM no inhibió la hipersensibilidad retardada, esto probablemente se deba a que las células T_H son activadas y expandidas por el DNCB llevado por las células presentadoras de antígeno. Estas células lo transportan a los nódulos linfoides donde las células T son activadas (T_{CD4+}). Una subsecuente exposición al DNCB induce la fase efectora, las células T_H secretan citocinas que son responsables del reclutamiento y la activación de macrófagos (80-90%) y otras células inflamatorias no específicas. Una reacción positiva en la piel indica que el individuo tiene una población de células T sensibilizadas específicas para el antígeno. El desarrollo de una lesión en la piel en individuos sensibilizados previamente produce una intensa infiltración de células en el sitio de inyección durante una reacción de DTH (Roitt, 1991).

Una función importante de la proteína N a nivel estructural es encapsidar y proteger al genoma. También está involucrada en el cambio entre la transcripción y la replicación viral (Wu *et al.* 2002).

La NC del VR ha sido reportada como un Superantígeno (SAg) específico para linfocitos T humanos V β 8 los cuales unen a HLA clase II, y son potentes activadores de linfocitos T humanos en vacunas para la rabia (Lafon *et al.* 1992). Esta actividad puede ser responsable de la hipersensibilidad observada en nuestros resultados.

El SAg de la rabia estimula respuestas T y B específicas a antígenos no relacionados, esta propiedad es la responsable de la capacidad adyuvante de la NC (Astoul *et al.* 1996).

El Gene bank reporta otros organismos que comparten 100% de secuencia con el FILM en sus genomas, como el virus sanfly fever el cual es transmitido por artrópodos que afectan al hombre y tiene efecto neurotrópico (Liu *et al.* 2003). Es posible que la secuencia completa actúa como un inmunomodulador favoreciendo la infección por el virus, esto será estudiado en un futuro cercano

CONCLUSIONES

- La proteína N recombinante estimuló la quimiotaxis de FM a diferencia del FILM que la inhibe.
- La proteína N recombinante estimuló la respuesta de la Hipersensibilidad retardada cutánea al DNCB; el FILM la inhibe.
- La proteína N recombinante inhibió el estallido respiratorio como lo hace el FILM.
- El péptido sintético Met-Gln-Cis-Asn que esta en la proteína N no reproduce todos los efectos biológicos que tiene el pentapéptido FILM
- Mientras el tripéptidoCys-Asn-Ser exhibe importante actividad anti-inflamatoria (datos no publicados).
- La secuencia completa del péptido FILM tiene que estar presente o por lo menos la secuenciaCys-Asn-Ser, además el residuo de Ser en particular el segmento ácido terminalCys-Asn-Ser del peptido –es crítico para la función del FILM.
- La escasa reacción inflamatoria vista en la rabia puede deberse a otras causas diferentes a la proteína N.

REFERENCIAS

- Aley S, Scott W y Cohn Z (1980). Plasma membrane of *Entamoeba histolytica*. J Exp Med 152:391-404.
- Altman D (1991). Practical Statistics for Medical Research. Chapman & Hall (CRC, London.
- Armitage P, Berry G y Matthews J (2002). Statistical Methods in Medical Research. Blackwell Science, Great Britain.
- Astoul E, Lafage M y Lafon M (1996). Rabies superantigen as a VβT-dependent adjuvant. J Exp Med 183:1623-1634.
- Boyum A (1968). Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Scand J Clin Lab Invest 21 (97):77-109.
- Bradford M (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ann Biochem 72:248-254.
- Celis A y Alva J (1970). Patología de la pobreza. Rev Med Hosp. Gen Mex 33: 371-386.
- Celis E, Miller W, Wiktor T, Dietzschold B y Koprowski H (1986). Isolation and characterization of human T cell lines and clones reactive to rabies virus: antigen specificity and production of interferon-γ. J Immunol 136:692-697.
- Celis E, Ou D, Dietzschold B y Koprowski H (1988). Recognition of rabies and rabies-related viruses by T cells derived from human vaccine recipients. J Virol 3128-3134.

- Charlton K y Casey G (1979). Experimental rabies in skunks:immunofluorescence light and electron microscopic studies. *Lab. Investig* 41:36-44.
- Chomczynski P y Sacchi N (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidineium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analyt Biochem* 162: 156-159.
- Claassen I, Osterhaus A y Claassen E (1995). Antigen detection in vivo after immunization with different presentation forms of rabies virus antigen:involvement of marginal metallophilic macrophages in the uptake of immune-stimulating complexes. *Eur J Immunol* 25:1446-1452.
- Conzelmann K, Cox J, Schneider L y Thiel H (1990). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology* 175:485-499.
- Coons A y Kaplan M (1950). Localization of antigen in tissue cells. II. Improvements in a method for the detection of antigen by means of a fluorescent antibody. *J Exp Med* 91:1-13.
- de Mattos C, de Mattos C, Smith J, Miller E, Papo S, Utrera A y Osburn B (1996). Genetic characterization of rabies field isolates from Venezuela. *J Clin Microbiol* 34:1553-1558.
- de Mattos C, de Mattos, Loza-Rubio E, Aguilar-Setián A, Orciari L y Smith J (1999). Molecular characterization of rabies virus isolates from Mexico: implications for transmisión dynamics and human risk. *Am J Trop Med Hyg* 61(4):587-597.

- Dietzschold B, Wang H, Rupprecht C, Celis E, Tollis M, Ertl H, Heber-Katz E y Koprowski H (1987). Induction of protective immunity against rabies by immunization with rabies virus ribonucleoproteína. Proc Natl Acad Sci USA 84:9165-9169.
- Drings A, Jallet C, Chambert B, Tordo N y Perrin P (1999). Is there an advantage to including the nucleoprotein in a rabies glycoprotein subunit vaccine? Vaccine 17:1549-1557.
- Espinosa C, Castañón G y Martínez P (1997). *In vivo* patogénesis of *Entamoeba dispar*. Arch Med Res 28 suppl:s204-s206.
- Ertl H, Dietzschold B, Gore M, Otvos Jr L, Larson J, Wunner W y Koprowski H (1989). Induction of rabies virus-specific T-helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotein. J Virol 63:2885-2892.
- Ezekowitz R y Hoffmann J (2003). Innate Immunity. N.J. Humana Press. To Towa.
- Fu Z, Dietzschold B, Schumacher C, Wunner W, Ertl H y Koprowski H (1991). Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. Proc Natl Acad Sci USA 88:2001-2005.
- Giménez-Scherer J, Pacheco-Cano M, Cruz de Lavin E, Hernández-Jauregui P y Merchant M (1987). Ultrastructural changes associated with the inhibition of monocyte chemotaxis caused by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. Lab Invest 57:45-51.
- Giménez-Scherer J, Rico R, Fernández D y Kretschmer R (1997). Inhibition of contact cutaneous delayed hypersensitivity reactions to DNCB in guinea pigs by the Monocyte

Locomotion Inhibitory Factor (MLIF) produced by axenically grown *Entamoeba histolytica*. Arch Med Res 28 suppl: s237-s238.

- Goldsby R, Kindt T y Osborne B (2000). Kuby Immunology. 4th ed. New York: W.H. Freeman and Company.
- Goto H, Minamoto N, Ito H, Ito N, Sugiyama M, Kinjo T y Kawai A (2000). Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic sites in the nucleoprotein of rabies virus. J Gen Virol 81:119-127.
- He X-S, Dragh M, Mahmood K, Holmes T, Kemble G y Dekker C (2004). T cell-dependent production of IFN- γ by NK cells in response to influenza A virus. J Clin Invest 114: 1812.
- Helfand S, Werkmeister J y Roder J. (1982). Chemiluminescence response of human natural killer cells. J Exp Med 156:492-505.
- Hemming V, Hall R, Rhodes P, Shigeoka A y Hill H (1976). J Clin Invest 58:1379.
- Herzog M, Fritzell C, Lafage M, Montaño H, Scott-Algara D y Lafon M (1991). T and B cell human responses to European bat *lyssavirus* after post-exposure rabies vaccination. Clin Exp Immunol 85:224-230.
- Hooper D, Morimoto K, Bette M, Weihe E, Koprowski H y Dietzschold B (1998). Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. J Virol 72:3711-3719.
- Hooper D, Pierard, Modelska A, Otvos L, Fang Fu Z, Koprowski H y Dietzschold B (1994). Rabies ribonucleocapsid as an oral immunogen and immunological enhancer. Proc Natl Acad Sci USA 91:10908-10912.

- Hostnik P y Bidovec A (1999). Modern rabies extermination methods-ten years of rabies control by orally vaccinating foxes in Slovenia. Res Rep-Univ Ljubl Vet Fac 36:223-230.
- Iwasaki Y, Gerhard W y Clark H (1977). Role of host immune response in the development of either encephalitic or paralytic disease after experimental rabies infection in mice. Infection & Immunity 18:220-225.
- Jervis H y Takeuchi A (1979). Amebic infection y enfermedad por *E. histolytica* infection in the gemfree guinea pig. Am J Pathol 94:197-200.
- Kasempimolporn S, Hemachudha T, Khawplod P y Manatsathit S (1991). Human immune response to rabies nucleocapsid and glycoprotein antigens. Clin Exp Immunol 84:195-199.
- Kawai A, Toriumi H, Tochikura T, Takahashi T, Honda Y y Morimoto K (1999). Nucleocapsid formation and/or subsequent conformational change of rabies virus nucleoprotein (N) is a prerequisite step for acquiring the phosphatase-sensitive epitope of monoclonal antibody 5-2-26. Virology 263:395-407.
- Klein JAB. In *Immunology*. ed. Blackwell-Science; 1997 452-464.
- Koser L, McGettigan J, Tan G, Smith M, Koprowsky H, Dietzschold B y Schnell M (2004). Rabies virus nucleoprotein as a carrier for foreign antigens. PNAS 102 (25):9405-9410.
- Kouznetzoff A, Bucle M y Tordo N (1998). Identification of a region of the rabies virus N protein involved in direct binding to the viral RNA. J Gen Virol 79:1005-1013.

- Kretschmer R y Collado M, Pacheco M, Salinas M, López O, Leucona M, Castro E y Arellano J (1985). Inhibition of human monocyte locomotion by products of axenically grown *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol* 7:527-543.
- Kretschmer R, Castro E, Arellano J y Pacheco M (1986). *In vitro* studies on the interaction of human monocytes and the monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica*. *Arch Invest Med* 11 suppl:243-246.
- Kretschmer R y Collado M (1980). Chemotaxis. *Infec* 8 suppl 3:s299-s304.
- Kretschmer R, Castro E, Pacheco G, Rico G, Diaz G y Arellano J (1991). The role of mannose in the receptor of the monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res* 77:374-378.
- Kretschmer R (1994). En: *Amibiasis infección y enfermedad por E. Histolytica*. Ed Trillas México D.F.
- Kretschmer R, Rico G y Giménez J (2001). A novel anti-inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*. *Molecular & Biochemical Parasitology* 112:201-209.
- Lafon M, Lafage M, Martínez-Arends A, Ramirez R, Vuilleier F, Charon D, Lotteau V y Scott-Algarat D (1992). Evidence for a viral superantigen in humans. *Nature* 358:507-508.
- Liu D, Tesh R, Travassos Da Rosa A, Peters C, Yang Z, Guzman H y Xiao S (2003). Phylogenetic relationship among members of the genus *Phlebovirus* (*Bunyaviridae*) based on partial M segment sequence analysis. *J Gen Virol* 84 (Pt. 2): 465-473.

- Loza Rubio E, Esquivel Guadarrama F, Mercado Solis J, Gutiérrez Xicotencatl L y Banda V (2003). Expresión del ARNm de la IL-2 en bazos de pollos vacunados contra el virus de la influenza aviar. *Téc Pecu Méx* 41(2):141-152.
- Martínez-Palomo A, Gonzáles R, y De la Torre M (1973). Selective agglutination of pathogenic strains of *Entamoeba histolytica* induced by ConA. *Nat New Biol.* 245 186-187.
- Martínez-Arends A, Astoul E, Lafage M y Lafon M (1995). Activation of human tonsil lymphocytes by rabies virus nucleocapsid superantigen. *Clin Immunol Immunopathol* 77:177-184.
- Mavrakis M, Iseni F, Mazza C, Schoehn G, Ebel C, Gentzel M, Franz T y Ruigrok R (2003). Isolation and Characterisation of the rabies virus N^o-P complex produced in insect cells. *Virology* 305:406-414.
- Meslin F, Kaplan M y Koprowski H, editors (1996). *Laboratory technique in rabies.* Geneva: World Health Organization.
- Murphy F, Gibbs E, Horzinek M & Studdert M, editors (1999) *Veterinary Virology.* San Diego: Academic Press.
- Oth D, Mercier G, Perrin P, Joffret M, Sureau P y Thibodeau L (1987). The association of the rabies glycoprotein with liposome (immunosome) induces an *in vitro* specific release of interleukin 2. *Cellular Immunol* 108:220-226.
- Paul W (1999). *Fundamental Immunology.* Philadelphia: Lippincott-Raven.
- Pérez-Tamayo R y Brandt (1971). In: *Amebiasis* ed. Williams and Wilkins. Baltimore p145.

- Pérez-Tamayo R (1986). Pathology of amebiasis In: Amebiasis ed. Elsevier. Amsterdam p45.
- Perrin P, Joffret M, Lecler C, Joffret M, Sureau P y Thibodeau L (1988). Interleukin 2 increases protection against experimental rabies. *Immunobiol* 177:199-209.
- Perrin P, Joffret M, Zanetti C, Bourhy H, Gontier C, Fritzell C, Lecler C y Sureau P (1991). Rabies-specific production of interleukin-2 by peripheral blood lymphocytes from human rabies vaccines. *Vaccine* 9:549-558.
- Perrin P, Tino De Franco M, Jallet C, Fouque F, Morgeaux S, Tordo N y Colle JH (1996). The antigen-specific cell-mediated immune response in mice is suppressed by infection with pathogenic lyssaviruses. *Res Virol* 147:289-299.
- Prosnjak M, Hooper C, Dietzschold B y Koprowski H (2001). Effect of rabies virus infection on gene expression in mouse brain. *PNAS* 98(5):2758-2763.
- Pulmanausahakul R, Faber M, Morimoto K, Spitsin S, Weihe E, Hooper D, Schnell M y Dietzschold B (2001). Overexpression of cytochrome c by a recombinant rabies virus attenuates pathogenicity and enhances antiviral immunity. *J Virol* 75(22):10800-10807.
- Ravdin J (1982) y Guerrant R (1982). A review of the parasite cellular mechanism involved in the pathogenesis of amebiasis. *Rev Infect Dis* 4:1185-1207.
- Ravdin J (1995). State-of-the-art clinical article. *Clin Infect Dis* 20:1453-1466.
- Reid-Sanden F, Sumner J, Smith J, Fekadu M, Shaddock J y Bellini W (1990). Rabies diagnostic reagents prepared from a rabies N gene recombinant expressed in baculovirus. *J Clin Microbiol* 28:858-863.

- Rico G, Díaz-Guerra O, Giménez-Scherer J y Kretschmer R (1992). Effect of the monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* upon the respiratory burst of human leucocytes. Arch Med Res 23:157-159.
- Rico G y Kretschmer R (1997). The monocyte locomotion inhibitory factor (MLIF) produced by axenically grown *Entamoeba histolytica* fails to affect the locomotion and the respiratory burst of human eosinophils *in vitro*. Arch Med Res 28:233-234.
- Roit I (1991). Essential Immunology. Blackwell Scientific Publications, London.
- Salata R, Pearson R y Ravdin J (1985). Interaction of human leucocytes and *Entamoeba histolytica* killing of virulent amebae by the activated macrophage. Clin Invest 76:491-499.
- Sargeant P (1990). The epidemiological aspects of *Entamoeba histolytica* zymodemes Mitt Oster Gess Tropenmed Parasitol 12:1.
- Schnell M, Foley H, Siler C, McGettigan J, Dietzschold B y Pomerantz R (2000). Recombinant rabies virus as potential live-viral vaccines for HIV-1. PNAS 97(7):3544-3549.
- Sigal H y Yacov R (1994). Immunology and inflammation basic mechanisms and clinical consequences. Ed. Mc Graw-hill, USA.
- Sokol F (1973). Purification of rabies virus and isolation of its components. In Laboratory techniques in rabies. Third Edition, Ed. by Kaplam M. & Koprowski H., World Health Organization Geneva, pp45-67.
- Sukathida U, Chareeporn S y Yaowapa M (2001). Inducible nitric oxide synthase inhibition delays death of rabies virus-infected mice. J Med Microbiol 50:238-242.

- Toriumi H, Honda Y, Morimoto K, Tochikura T y Kawai A (2002). Structural relationship between nucleocapsid-binding activity of the rabies virus phosphoprotein (P) and exposure of epitope 402-13 located at the C terminus. *J Gen Virol* 83:3035-3043.
- Trissl D, Martínez-Palomo A, Argüello, De la Torre M y De la Hoz R (1977). Surface properties related to concanavalin A induced agglutination. A comparative study of several *Entamoeba* strains. *J Exp Med* 145:152-155.
- Tsutsumi J y Martínez-Palomo A (1988). Inflammatory reaction in experimental hepatic amebiasis. *American J Pathol* 130:112-119.
- Walsh J (1986a). Amebiasis in the world. *Arch Invest Med* 17:s385-s389.
- Walsh J (1986b). Problems in recognition and diagnosis of amebiasis estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. *Rev Infect Dis* 8:228-238.
- Walsh J (1988). In: *Amibiasis, human infection by Entamoeba histolytica*. Ed Churchill Livingstone, New York p93-105.
- Wang W, Keller K, y Chadee K (1994). *Entamoeba histolytica* modulates the nitric oxidesynthase and nitric oxide production by macrophages for cytotoxicity against amoebae and tumour cells. *Immunol* 83:601.
- Ward P (1968). Chemotactic mononuclear cells. *J Exp Med* 138:1201-1221.
- Ward P y Maderazo E (1980). Leukocyte chemotaxis. In: *manual of clinical immunology*, Noel R y Herman F. American Society for Microbiology, Washington D.C. p 261.

- Weber F, Kochs G y Haller O (2004). Inverse interference: how viruses fight the interferon system. *Viral Immunol* 17: 498-515.
- Wiktor T, György E, Dieter Schlumberger H, Sokol F y Koprowski H (1973). Antigenic properties of rabies virus components. *J Immunol* 110:269-276.
- Wu X, Gong X, Foley H, Schnell M y Fu Z (2002). Both Viral Transcription are reduced when the rabies virus nucleoprotein is not phosphorylated. *J Virol* 76:4153-4161.
- Wu X, Lei X y Fu Z (2003). Rabies virus nucleoprotein is phosphorylated by cellular casein kinase II. *Biochem Biophys Res Commun* 304:333-338.
- Zigmond S y Hirsh J (1973). Leukocyte locomotion and chemotaxis; new methos for evaluation and demonstration of a cell derived chemotactic factor. *J Exp Med* 137: 387-410.

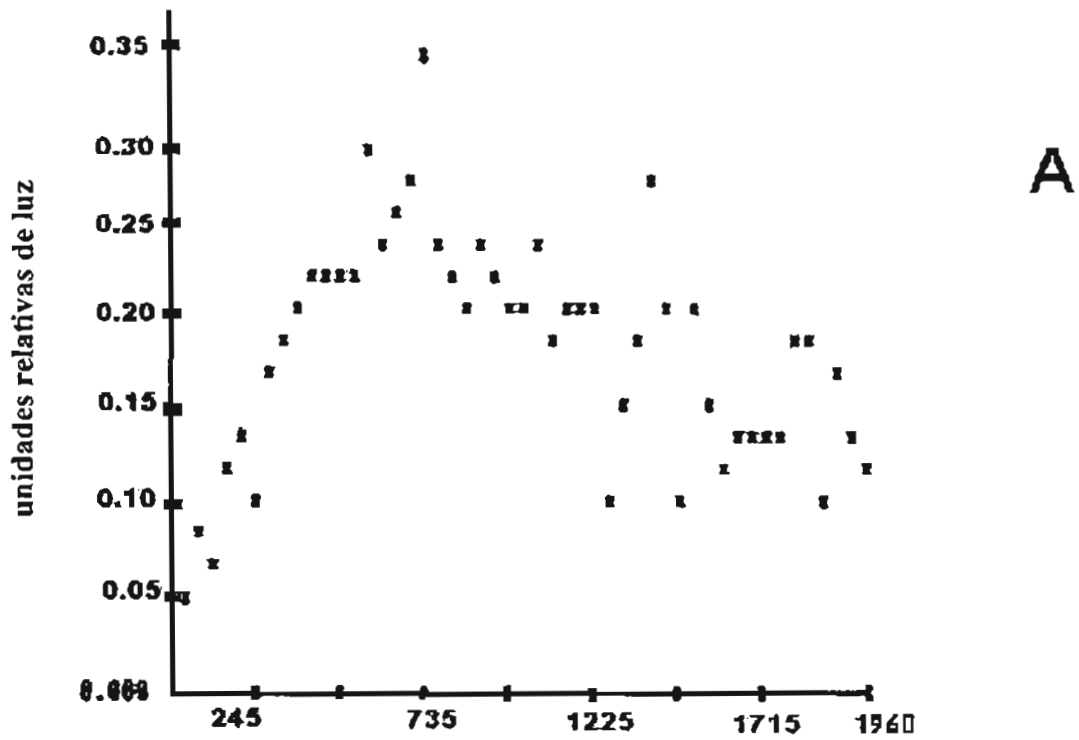


Figura 1A.-Patrón del estallido respiratorio de FM incubados con zimosan opsonizado y medidos por quimioluminiscencia.

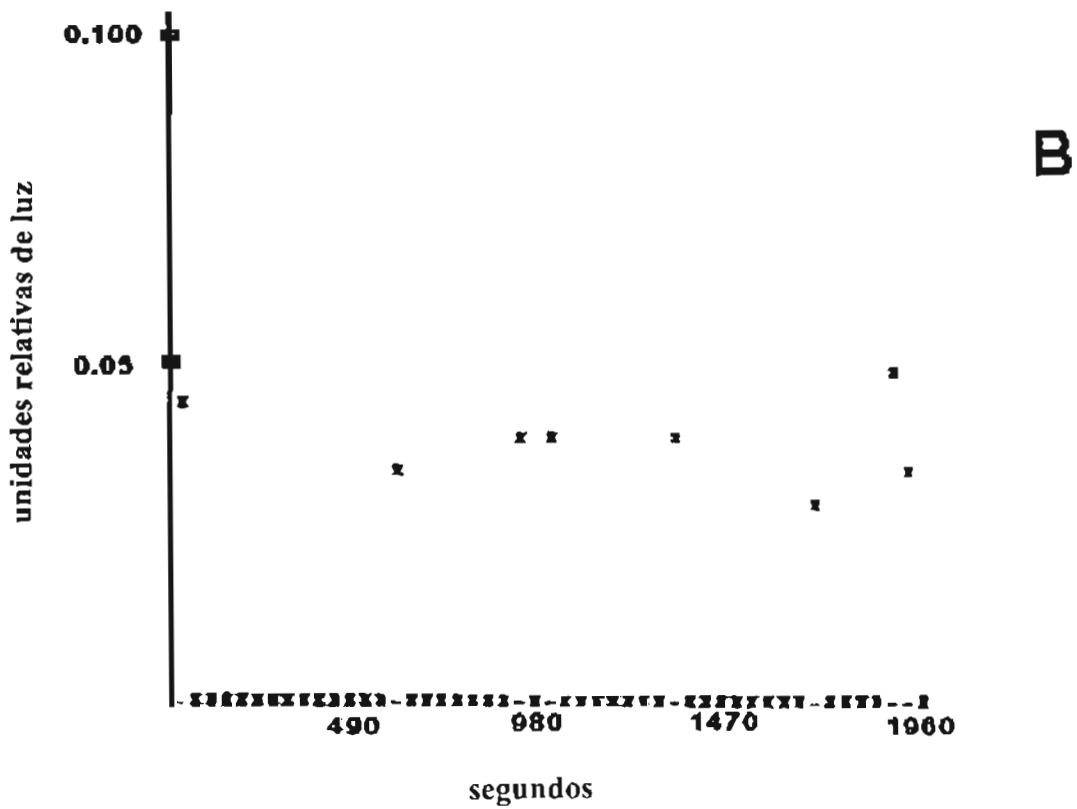
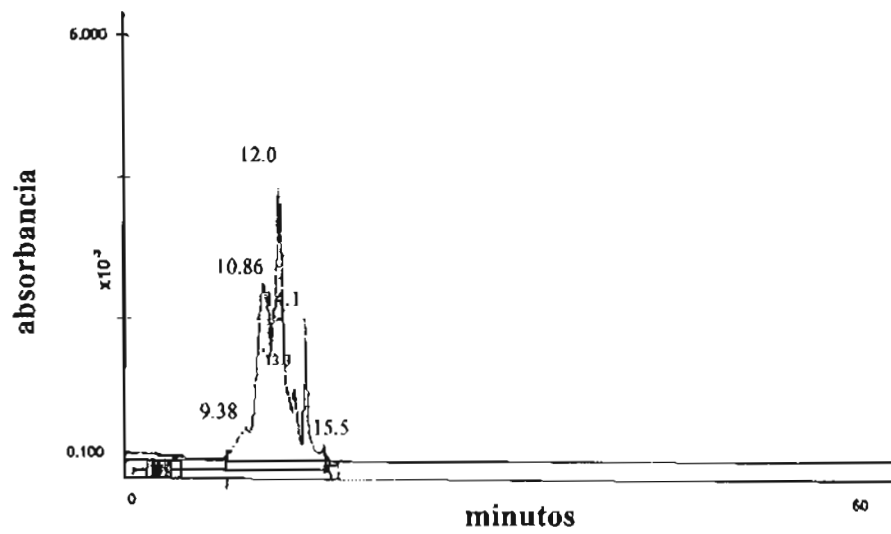
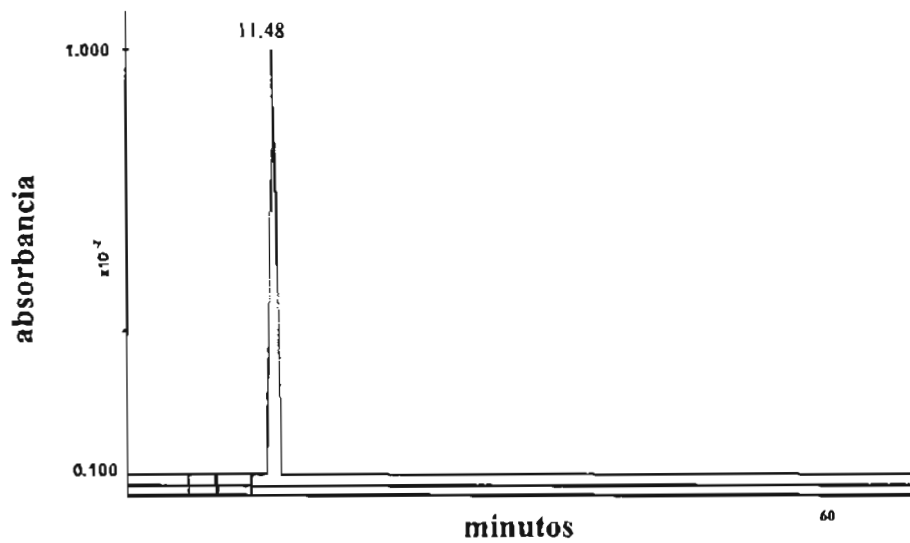


Figura 1B.-Efecto de la nucleocápside no purificada del virus de la rabia sobre el estallido respiratorio de FM, medidos por quimioluminiscencia.



A

Figura 2A.-Cromatograma de la nucleocápside del virus de la rabia obtenida por infección de la línea BHK-21. El tercer pico con tiempo de retención de 12 min, corresponde a la nucleocápside.



B

Figura 2B.-Patrón obtenido al inyectar el marcador citocromo C, en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución.

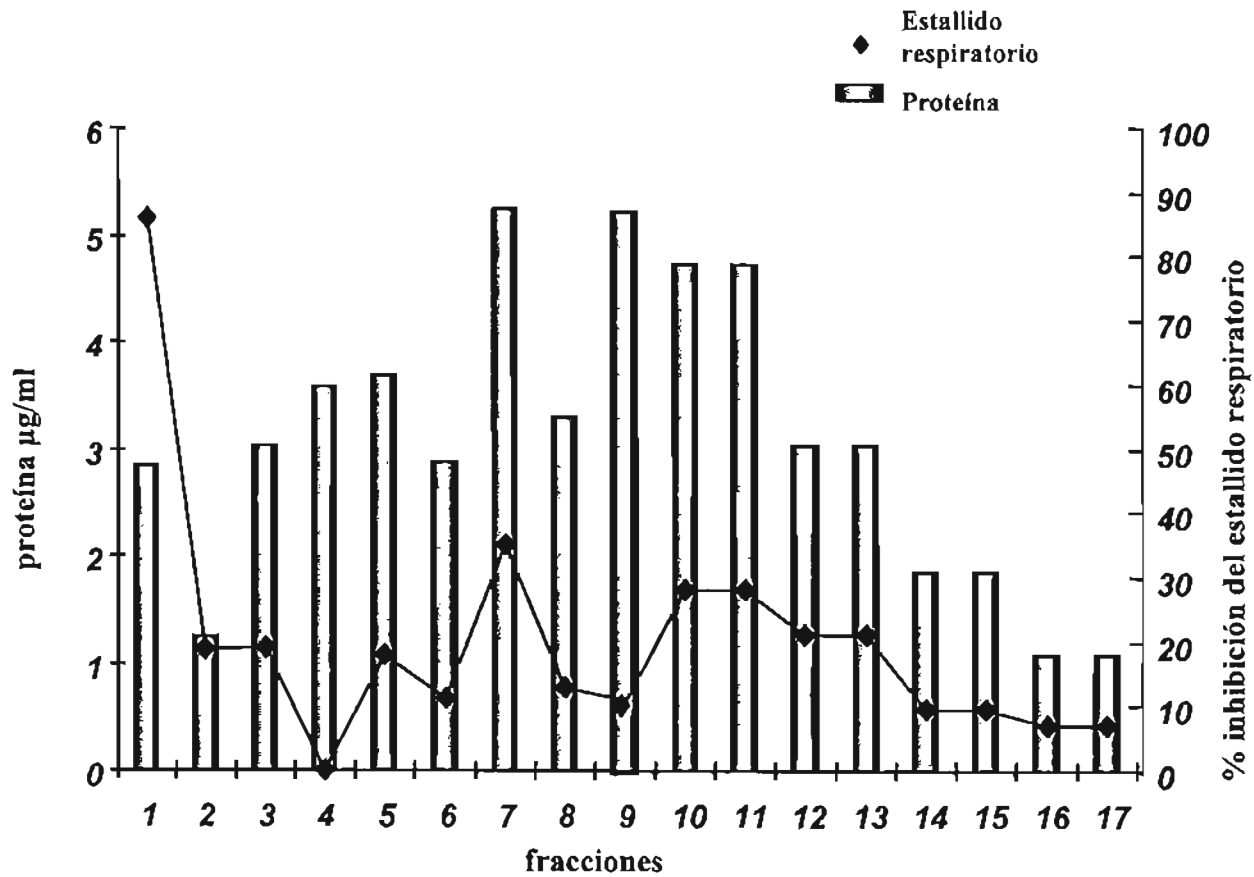


Figura 3.- Purificación de la NC en un gradiente de CsCl. Se obtuvieron 17 fracciones a las que se les determinó la concentración de proteína y porcentaje de inhibición del estallido respiratorio en FM.

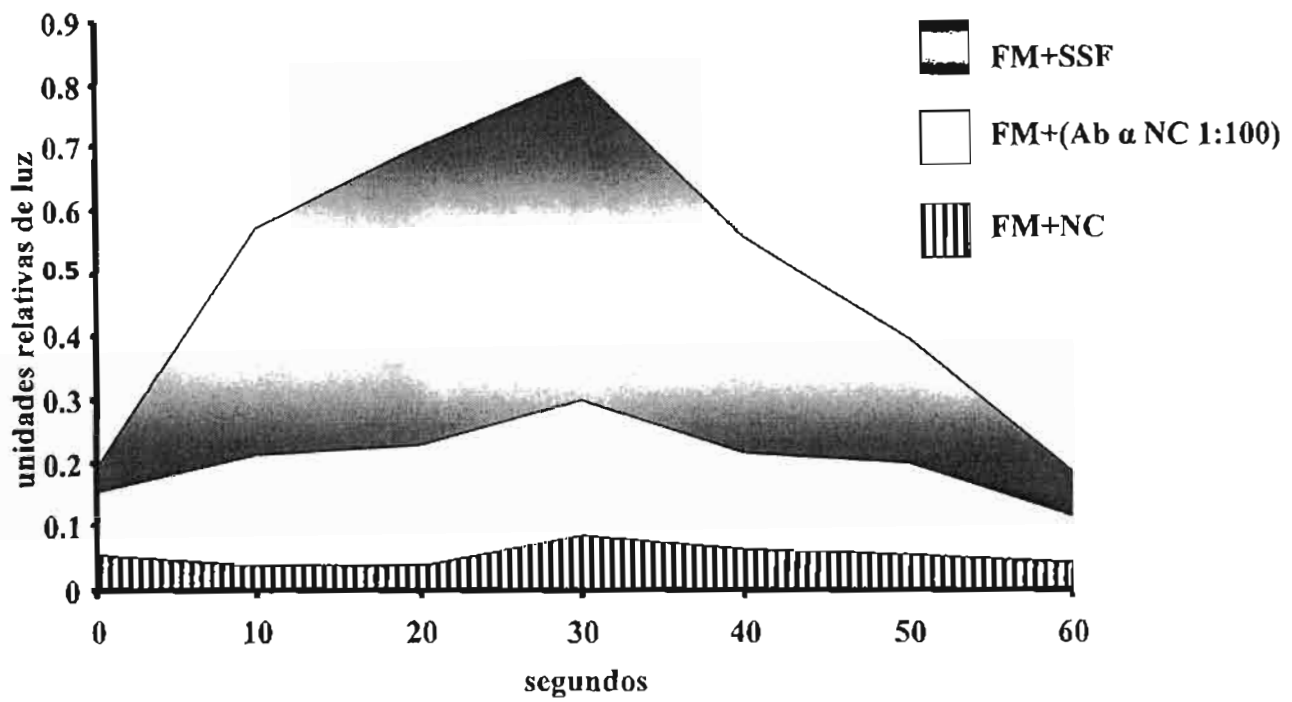


Figura 4.-Bloqueo de la NC con un Ab α NC. Estallido respiratorio de FM expresado como área bajo la curva: con SSF 19.37 mm², con NC sin purificar 3.27 mm² y la NC con un Ab α NC 1:100 9.6 mm².

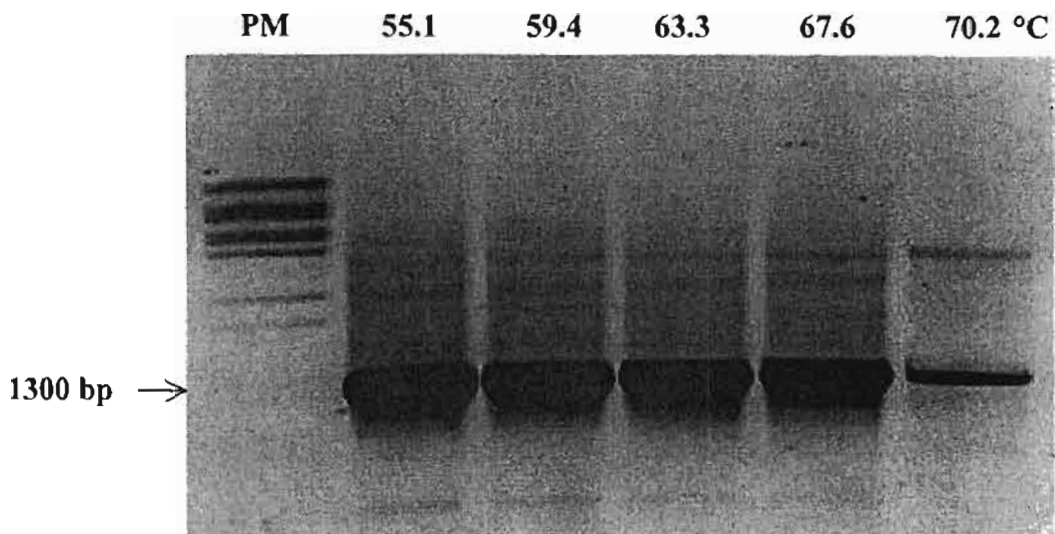


Figura 5.- Gradiente de temperatura (55.1, 59.4, 63.3, 67.6,70.2°C) para obtener cDNA. La temperatura seleccionada para los PCRs fue de 68°C. Extremo izquierdo marcador λ (DNA BstE II Digest). El gen que corresponde al fragmento de la proteína N se encontró a 1300pb.

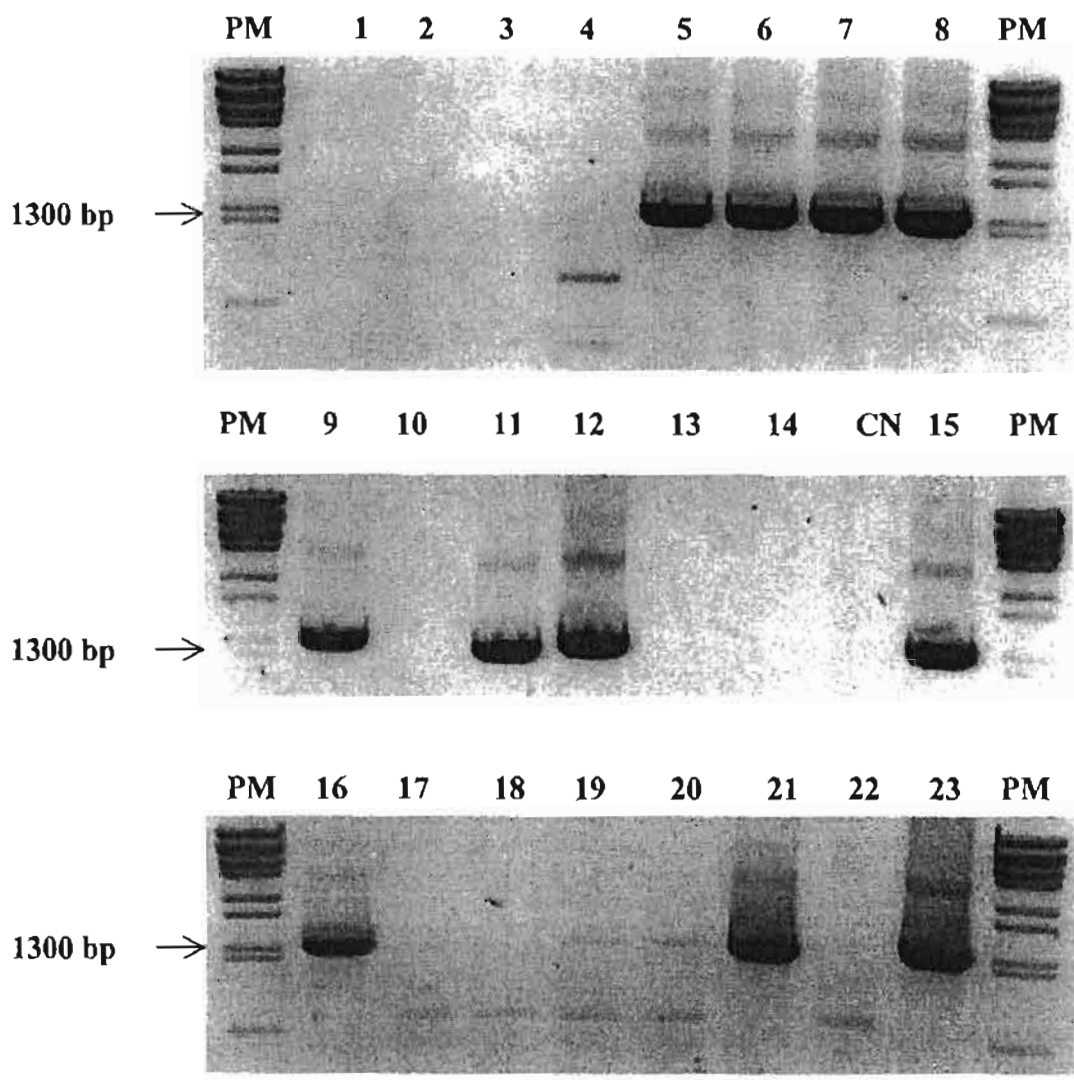


Figura 6.- Análisis de la orientación del fragmento del gen de la proteína N en el pUC-19 usando un primer universal. Se obtuvieron 23 clonas por transformación a las que se les realizó PCRs con el primer universal. Las clonas amplificadas para el primer utilizado se observan a 1300pb.

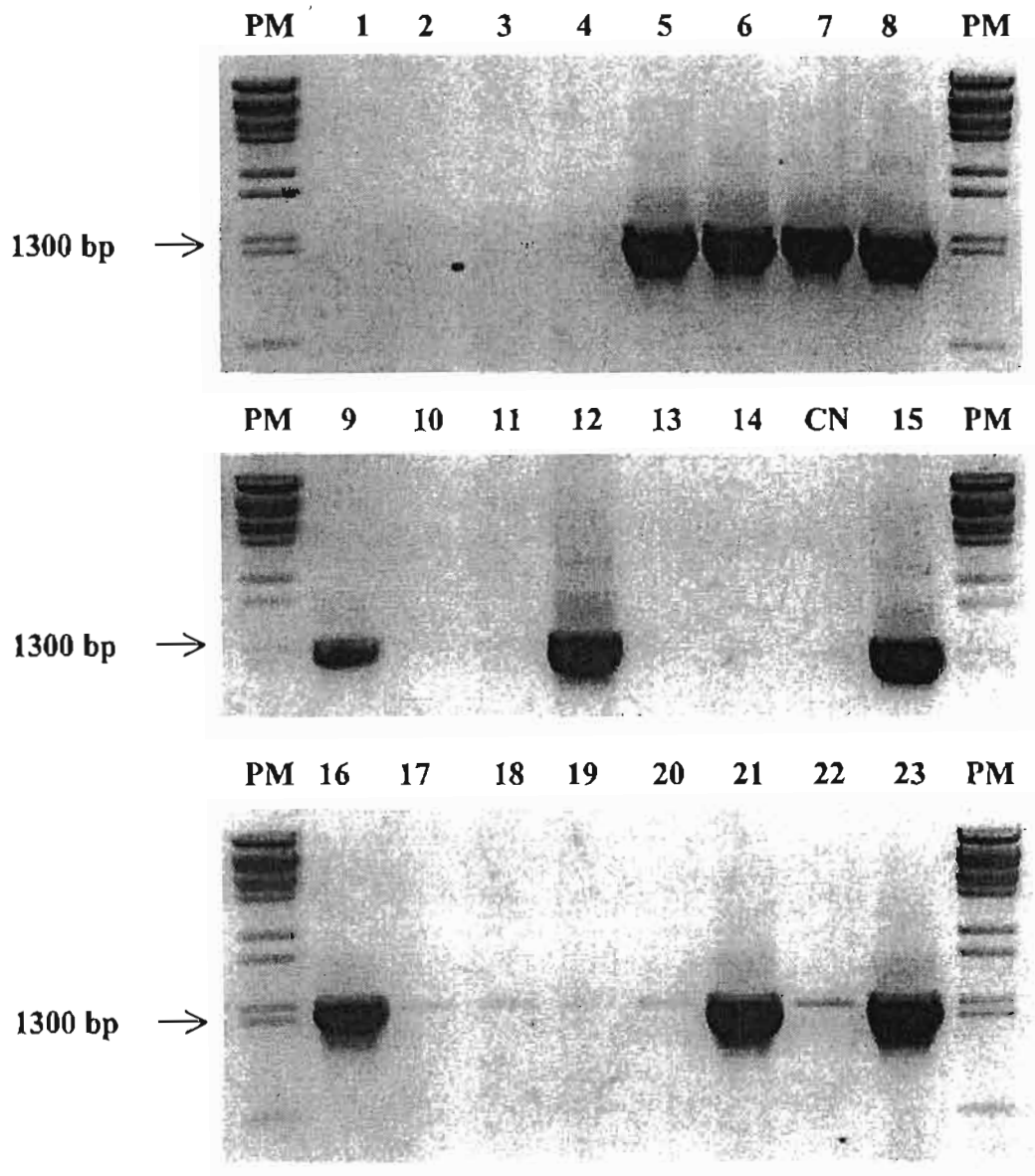


Figura 7.-Análisis de la orientación del fragmento del gen de la proteína N en el pUC-19 usando un primer específico. Se obtuvieron 23 clonas por transformación a las que se les realizó PCRs con el primer específico. Amplificaron 9 clonas para el primer específico, se observan a 1300pb.

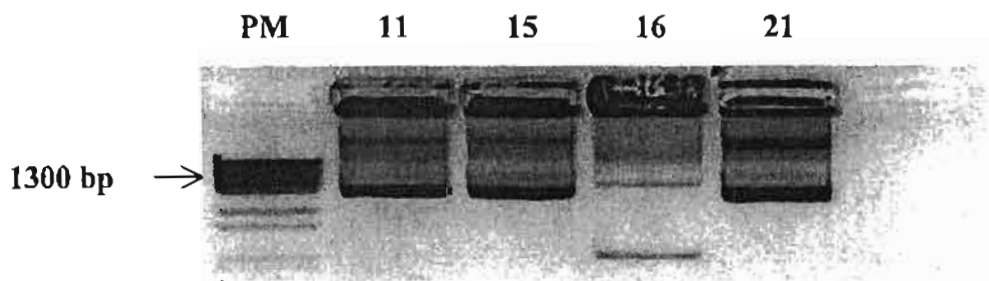
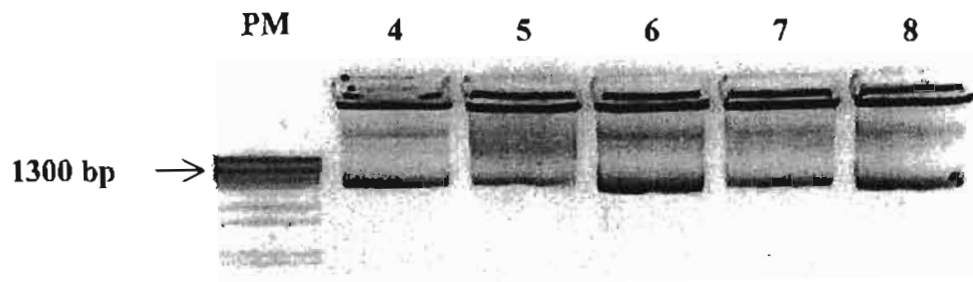


Figura 8.-Verificación de las clonas amplificadas con el pUC-19 usando primers universal y específico: 4,5,6,7,8,11,15,16,21.

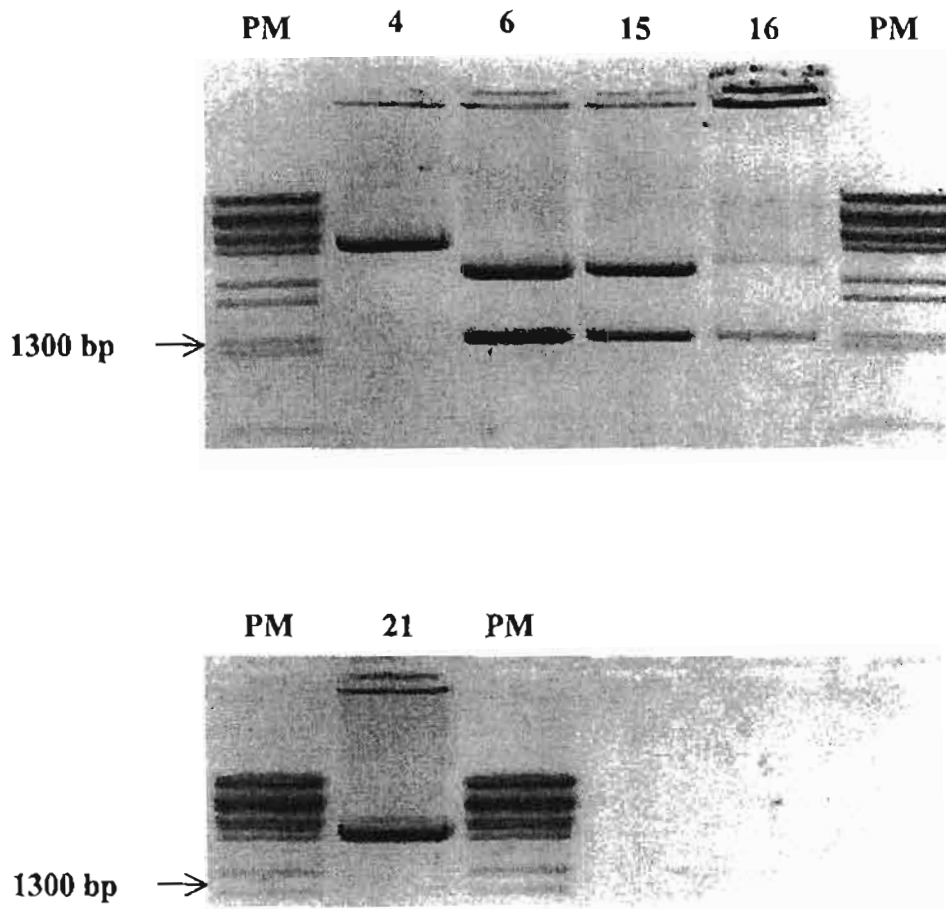


Figura 9.-Digestión con la enzima BamHI. El corte con la enzima entre el plásmido y el fragmento del gen de la proteína N está presente en las clonas 6, 15, 16, 21.

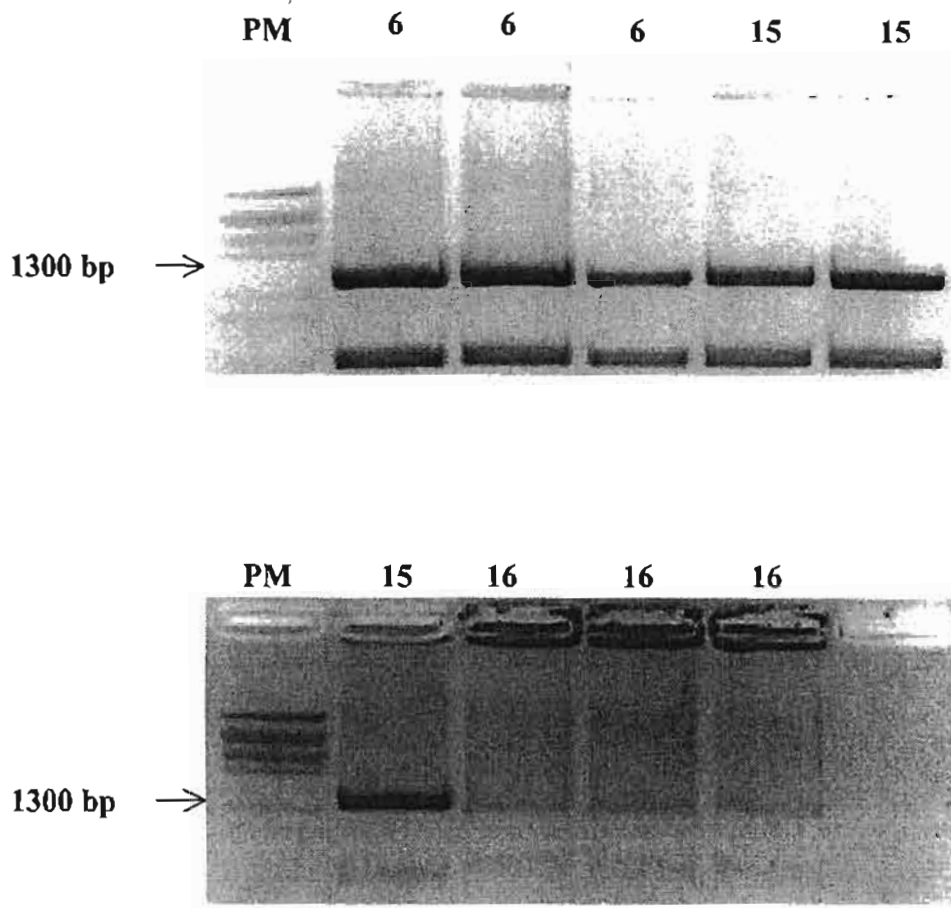


Figura 10.-Purificación del fragmento del gen de la proteína N por electroelución con NaI de tres clonas obtenidas de la digestión con BamH1.

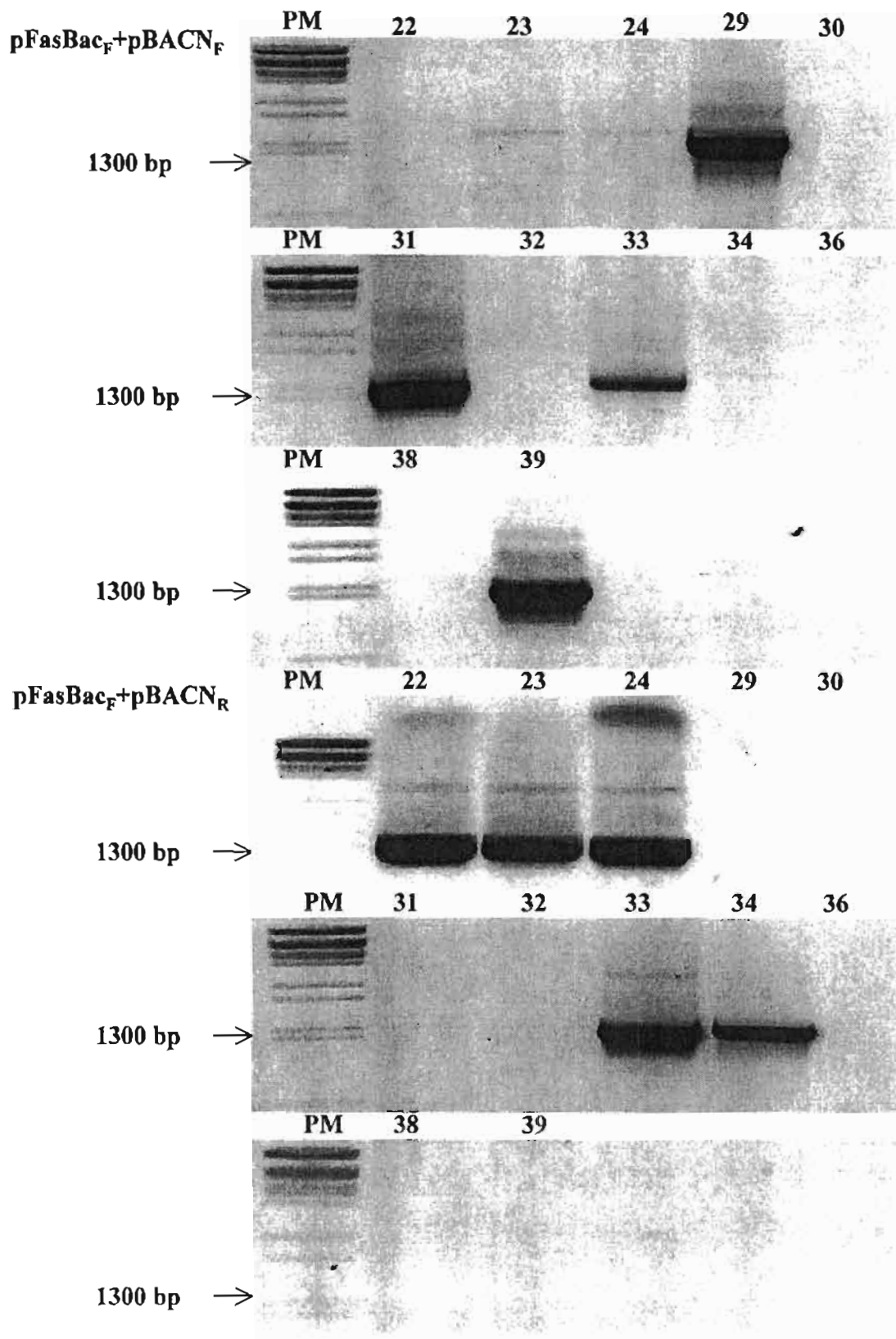


Figura 11.-Selección de la orientación del gen de la proteína N en el baculovirus usando $pFasBac_F + pBACN_F$ y $pFasBac_F + pBACN_R$. Las imágenes amplificadas utilizando $pFasBac_F + pBACN_R$ a 1300pb son las correctamente orientadas: 22,23,24,34.

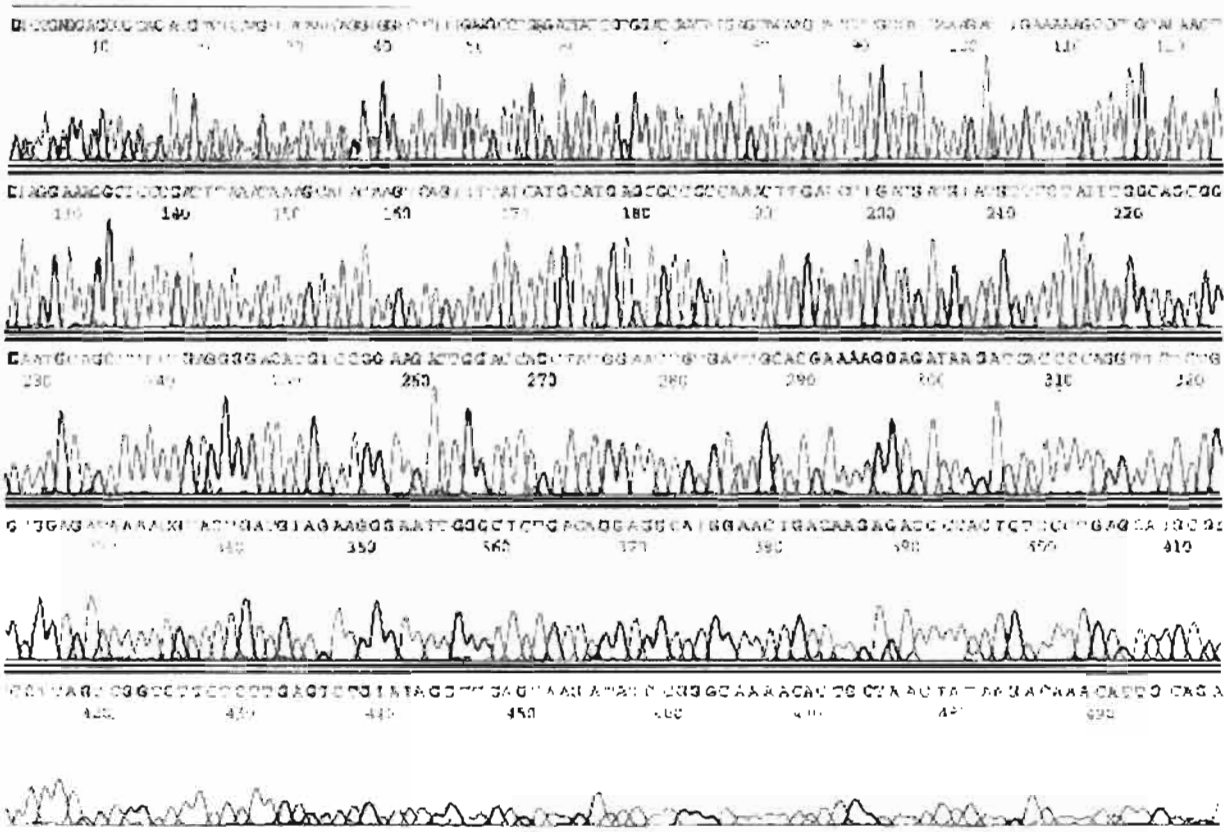


Figura 12.-Patrón de secuenciación de una clona amplificada en el baculovirus.

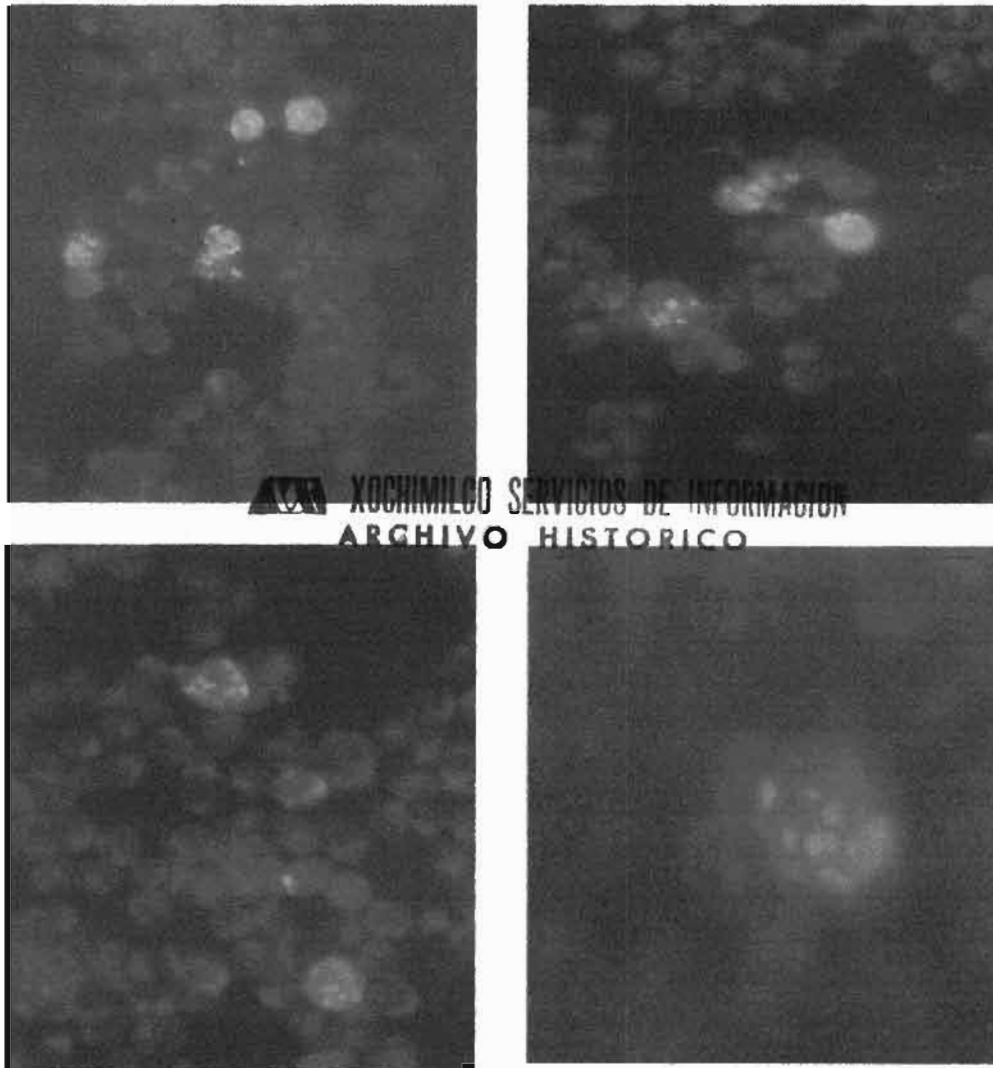


Figura 13.-Inmunofluorescencia. Células de insecto transfectadas con DNA recombinante de la proteína N. La fluorescencia indica la presencia de la proteína N en las células de insecto.

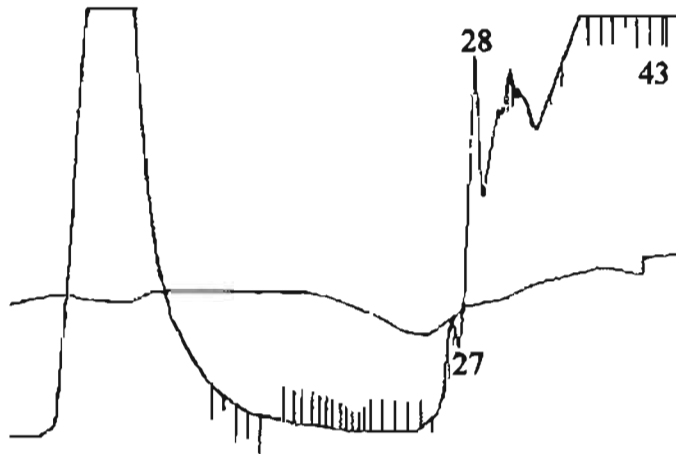


Figura 14.- Purificación de la proteína N usando como referencia su cola de histidinas, empleando una columna de Ni-Nta.

SSF NC 27 28 29 CN

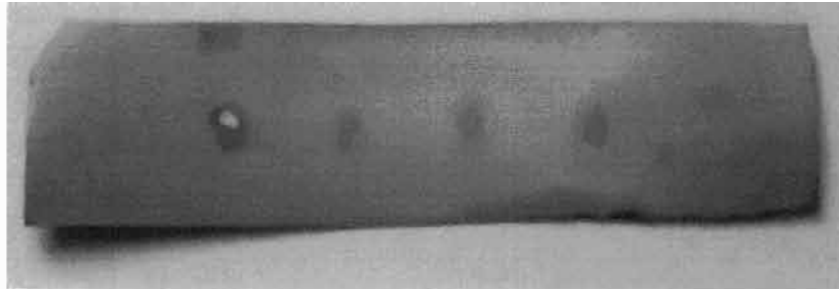


Figura 15.-Dot blot en las fracciones 27, 28, 29 obtenidas por purificación de la proteína N. Control positivo: Nucleocápside (NC) obtenida por infección de la línea celular BHK-21, el color café señala positividad. Control negativo: SSF.

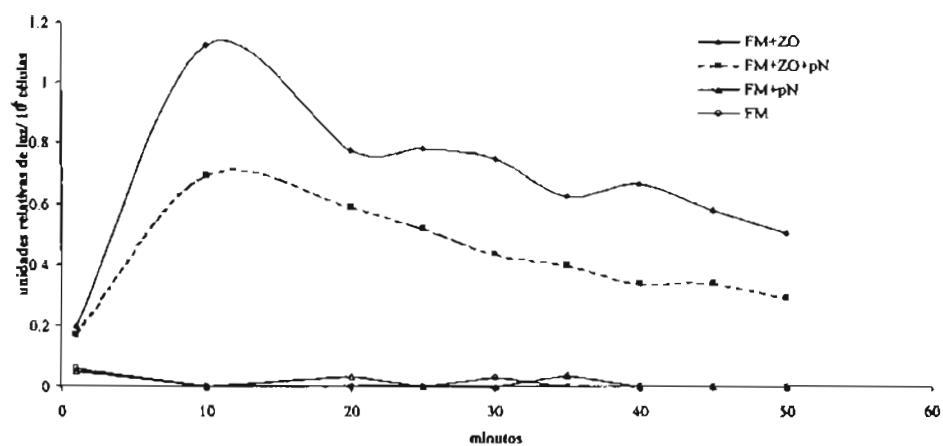


Figura 16.- Efecto de la proteína N sobre el estallido respiratorio de fagocitos mononucleares humanos.

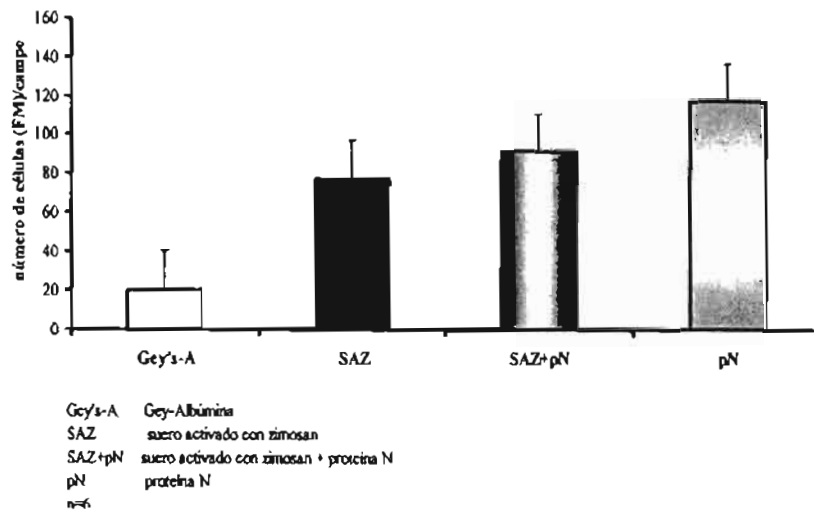


Figura 17.-Efecto de la proteína N sobre la locomoción de fagocitos mononucleares humanos, medidos por quimiotaxis. pN proteína N; SAZ suero activado con zimosan.

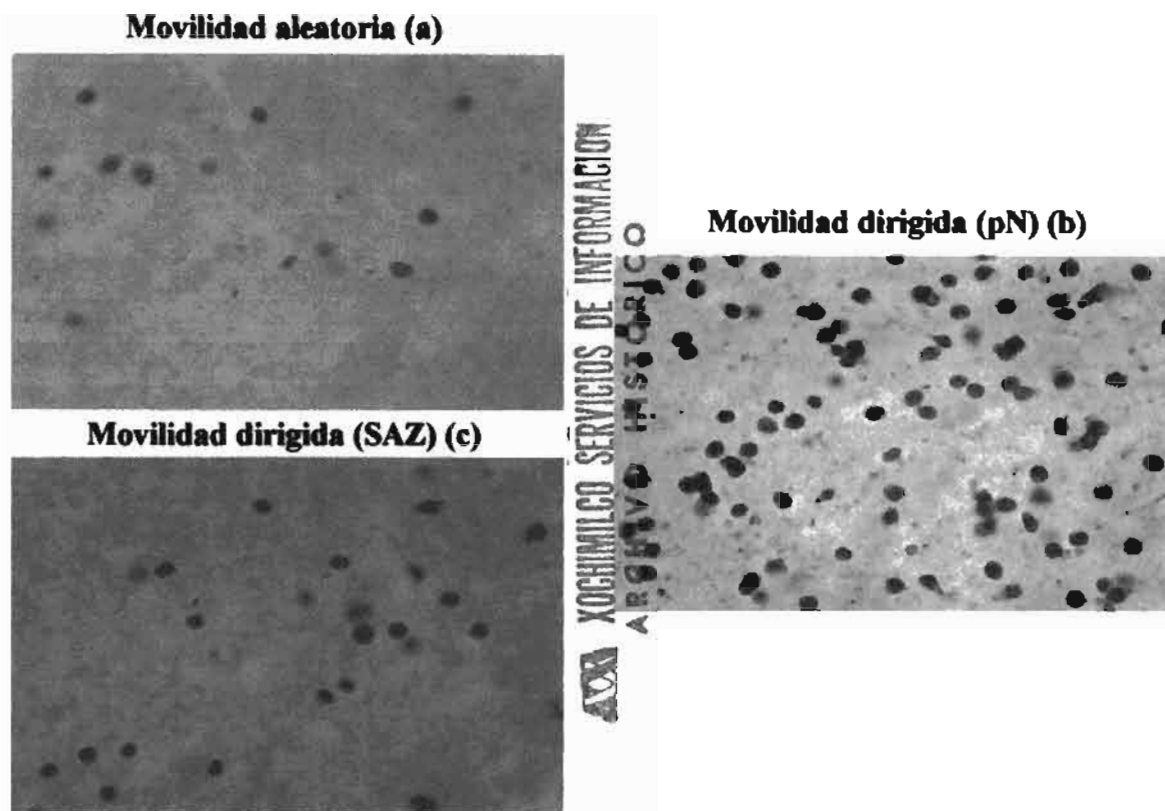


Figura 18.- Movilidad de fagocitos mononucleares humanos: (a) aleatoria (b) dirigida (pN) (c) dirigida (SAZ)



(a) Cobayo control



(b) Cobayo retado

Figura 19.- Hipersensibilidad retardada cutánea. Cobayos retados con proteína N
(a) Control negativo (b) proteína N (5,27, 54 µg/0.05 ml).

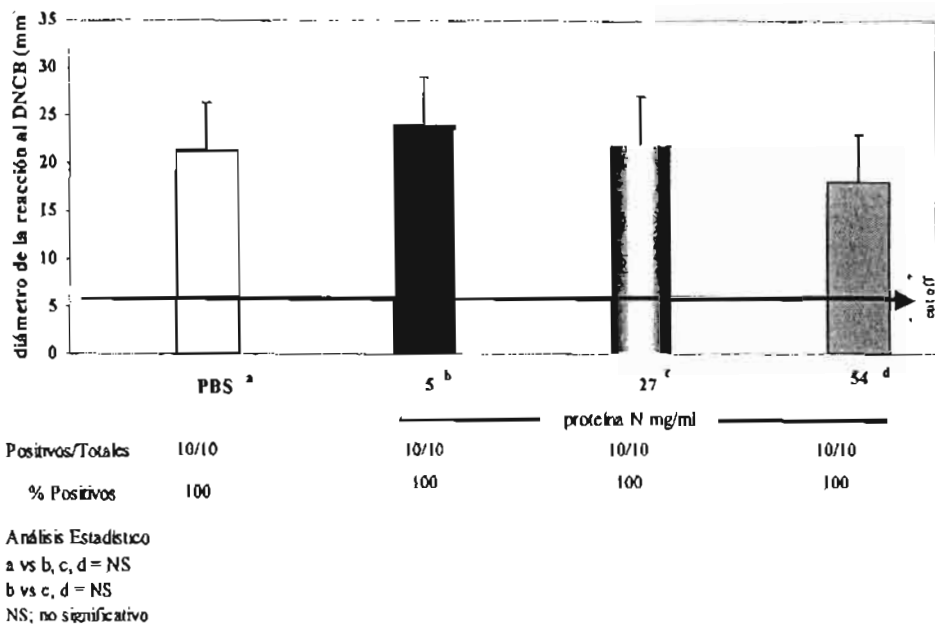


Figura 20.-Efecto de la proteína N sobre la hipersensibilidad retardada cutánea producida por el DNCB en cobayos. Las reacciones positivas (+) y negativas (-) valor de corte = 5mm de diámetro. Se inyectó 0.05 ml de la pN a tres concentraciones: 5,27, 54 μ g/ml. DNCB, 1-cloro-2-4-dinitrobeneno; SSF, solución salina fisiológica; pN, proteína N.

5 M. E. Morales · G. Rico · J. L. Gómez · R. Alonso ·
6 R. Cortés · R. Silva · J. A. Giménez ·
7 R. Kretschmer · A. Aguilar-Setién

8 Homologous sequence of anti-inflammatory pentapeptide (MLIF) 9 produced by *Entamoeba histolytica* in the N protein of rabies 10 virus could affect the inflammatory process?

11 Received: 28 May 2005 / Accepted: 20 September 2005
12 © Springer-Verlag 2005

13 **Abstract** Amebiasis and rabies are public health prob-
14 lems, and they have in common a poor inflammatory effect
15 in the target organs that they affect. In the GenBank, it was
16 found that the anti-inflammatory peptide monocyte loco-
17 motion inhibitory factor (MLIF) produced by *Entamoeba*
18 *histolytica* homologates 80%, with a fragment of the N
19 protein of the rabies virus. We speculated if the N protein
20 could contribute to the scant inflammatory reaction
21 produced by rabies virus in central nervous system. The
22 N protein was obtained and studied in vitro and in vivo.
23 The N protein, as MLIF, inhibited the respiratory burst in
24 human mononuclear phagocytes (43%, $p < 0.05$), but in
25 contrast to MLIF, it increased chemotaxis and it did not
26 significantly inhibit delayed hypersensitivity skin reaction
27 to 1-chloro-2-4-dinitrobenzene in guinea pigs. Therefore,
28 the full peptide sequence has to be present or it has to be
29 cleaved—free from the large recombinant N protein
30 molecule (55 kDa) to become active.

Keywords *E. histolytica* · Rabies virus N protein ·
MLIF · Inflammation

Abbreviations BACNF: forward primer · BACNR:
reverse primer · CNS: central nervous system · DNCB:
1-chloro-2-4-dinitrobenzene · FBS: fetal bovine serum · IC:
intracerebral · LB: Luria broth · IMSS: Instituto Mexicano
del Seguro Social · MILF: monocyte locomotion inhibitory
factor · MP: mononuclear phagocyte/monocyte · OZ:
opsonized zymosan · PBS: phosphate-buffered saline
solution · Sf: *Spodoptera frugiperda* · UAM: Universidad
Autónoma Metropolitana · UNAM: Universidad Nacional
Autónoma de México

Introduction

The extracellular protozoan *Entamoeba histolytica* causes
 50×10^6 cases of invasive amebiasis worldwide (WHO
1995; WHO/PAHO/UNESCO 1997), mostly amebic dys-
entery but occasionally produces extraintestinal disease
such as amebic abscess of the liver (AAL) with a strikingly
scarce, late inflammatory reaction. *E. histolytica* produces
a pentapeptide Met-Gln-Cys-Asn-Ser [monocyte loco-
motion inhibitory factor (MLIF)] that inhibits human mono-
nuclear phagocyte (MP) locomotion in vitro, but not that of
neutrophil polymorphonuclear (nPMN) leukocyte or eosino-
phil PMN (ePMN) (Kretschmer et al. 2001), and in vivo,
delays the arrival of MP in human Rebeck skin windows
(Kretschmer et al. 1985), and inhibits delayed hypersen-
sitivity skin reactions to 1-chloro-2-4-dinitrobenzene
(DNCB) in guinea pigs and gerbils (Giménez-Scherer et
al. 1987). MLIF also cancels the respiratory burst in MP
and nPMN but not in ePMN (Rico et al. 1998); MLIF may
contribute to the scarce, late inflammatory reaction seen in
AAL and in turn to the perfect regeneration (*restitutio ad*
integrum) of the damaged tissues (liver and skin) upon
recovery. Unlike other neuroviruses (equine encephalitis,
herpetic encephalitis, etc.), rabies virus also produces little
inflammation in the central nervous system (CNS) (Kucera
and Myrvik 1985). Electromicroscopy, immunofluores-

This paper is the result of the thesis work for obtaining Ph.D. degree in
Ciencias Biológicas por la Universidad Autónoma Metropolitana

M. E. Morales (✉) · G. Rico · R. Silva · J. A. Giménez
R. Kretschmer · A. Aguilar-Setién
Unidad de Investigación Médica en Inmunología,
Unidad Médica de Alta Especialidad,
Hospital de Pediatría,
Centro Médico Nacional Siglo XXI,
IMSS, Av. Cuauhtémoc,
No. 330, Col. Doctores,
CP 06720, Mexico City, DF Mexico
e-mail: est-momag@hotmail.com
Tel.: +52-55-56276943
Fax: +52-55-56276943

J. L. Gómez
Laboratorio de Biomembranas,
Departamento de Ciencias de la Salud,
UAM, Iztapalapa,
Mexico City, Mexico

R. Alonso · R. Cortés
Laboratorio de Genética Molecular,
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM,
Mexico City, DF Mexico

68	cence, and immunohistochemistry studies have revealed a	<i>Isolation of recombinant bacmid DNA</i>	White colonies	122
69	weak neurocytopathic effect, only a scarce inflammatory		were selected for isolation of recombinant bacmid DNA.	123
70	reaction, in important lethal neurological dysfunction in			
71	rabies (Murphy et al. 1999). Rabies virus can induce	<i>Sf9 cells culture</i>	Cells were maintained <i>Spodoptera frugi-</i>	124
72	immunodepression in infected animals, with deficient		<i>perda</i> (Sf)-900 II SFM (Gibco Laboratories, Life Technolo-	125
73	production of interleukin 2 (Perrin et al. 1988). Thus,		gies, Inc.) with 10% fetal bovine serum. Insect cells were	126
74	amebiasis and rabies share a weak inflammatory reaction in		infected with a recombinant baculovirus obtained after	127
75	tissue damage. The rabies virus N protein is produced		transfection of Sf9 cells with a recombinant transfer vector	128
76	earlier and in larger quantity than other proteins, induces		containing rabies N protein gene (Mavraklis et al. 2003).	129
77	humoral and cellular immune responses (Dietzschold et al.			
78	1987; Astoul et al. 1996), and is of central importance in	<i>Immunofluorescence</i>	Cells were seeded in tubes and,	130
79	antigen diagnosis of the disease (Meslin et al. 1996).		stained with 0.1 ml of fluoresceinated anti-nucleocapside	131
80	Eighty percent of the sequence of MLIF is present in the N		antibody (Bacr Laboratory, México City), were incubated	132
81	protein of rabies virus (Met-Gln-Cys-Asn-x) (National		for 30 min at 37°C. The supernatant fluid (SN) was	133
82	Center for Biotechnology Information 2004).		eliminated, and the suspended pellet was observed by	134
83	Given the anti-inflammatory effects of MLIF and its		immunofluorescence.	135
84	homology within the N protein, we speculated if this			
85	protein could contribute to the scant inflammatory reaction	<i>Protein N purification</i>	SN was purified with AKTAPrime,	136
86	observed in CNS rabies. We therefore evaluated if the N		using an affinity column for Ni-NTA (HiTrap Chelating	137
87	protein of the rabies virus—or some fragment of it—		HP) with three buffers: binding buffer, Ni-loading eluent,	138
88	inhibits inflammatory processes in vivo and in vitro.		and elution buffer following the manufacturer's instruc-	139
			tions (Amersham Pharmacia Biotech AB, Uppsala,	140
			Sweden). Forty-four fractions were collected, and those	141
89	Materials and methods		containing the N protein were selected.	142
90	<i>N protein production</i>		Desalting was performed using a 5-ml HiTrap desalting	143
91	Total RNA was isolated from mouse		column. Fifteen eluted fractions were collected, and those	144
92	brain, previously intracerebral-infected with rabies virus		without imidazole were selected. Samples were dialyzed	145
93	(challenge virus standard), using TRIZOL (Gibco Labora-		and lyophilized.	146
94	tories, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY, USA) as		The specificity of purified fractions was determined by	147
95	described (Chomczynski and Sacchi 1987). RNA purity		dot blot.	148
96	was established in the 0.3% denaturing agarose gels, and			
97	the concentration was determined. For reverse transcrip-	<i>Monocyte locomotion inhibitory factor (Met-Gln-Cys-Asn-</i>		149
98	tion, 0.5 µg of total RNA was mixed with 1 µl of	<i>Ser)</i>	A 96% pure constructs of MLIF was commercially	150
99	deoxyribonucleotide triphosphates and 1.4 µl (250 ng/ml)		obtained from American Peptide Co., Sunnyvale, CA, USA.	151
100	of primer BACNR 1:10 for reverse transcription. The			
101	mixture was incubated at 65°C for 5 min and at 4°C for	<i>Isolation of human mononuclear phagocyte</i>	Heparinized	152
102	5 min, and then, 1 µl RNAase, 4 µl of buffer 5 ^x , and 1 µl		blood (10 IU/ml heparin) from healthy, fasting, nonsmok-	153
103	0.1 M dithiothreitol were added, and the resulting cDNA		ing adult donors was diluted 1:2 with phosphate-buffered	154
104	was amplified.		saline (PBS; pH 7.2). Samples of 10 ml were layered over	155
105	A sample of the amplified products was electrophoretic-		5-ml Ficoll Hypaque gradient (density=1.077) and centri-	156
106	ally separated on a 3% agarose gel and visualized by		fuged for 40 min at 400×g at 20°C. The cells in the	157
107	ethidium bromide staining. N protein gene was cloned		interface were removed and washed three times with PBS.	158
108	using pUC19/ <i>smal</i> /TA, and transformed clones were			
109	selected by Luria broth medium. PCR was used to	<i>Chemotaxin</i>	Fresh human AB Rh+ serum was kept frozen	159
110	confirm N protein orientation using universal (M13/		in 2-ml aliquots at -70°C and was used throughout the	160
111	pUC) and specific primer (BACN).		experiment.	161
112	Clones with N protein gene were digested with <i>Bam</i> HI.		On the day of the experiment, two aliquots were thawed	162
113	The resulting DNA was evaluated by electrophoresis;		in a water bath at 37°C, and 4 mg/ml of zymosan was	163
114	subsequently, the N protein gene was ligated to pFast-Bact		added [zymosan-activated serum (ZAS)]. The zymosan	164
	<i>Hta/Bam</i> HI/FAC.		was eliminated by centrifugation by the Ward method.	165
115	<i>Orientation, sequencing, and alienating of identity</i>	<i>In vitro cell locomotion assays</i>	The locomotion of MP was	166
116	The orientation was viewed using specific and pFast-Bac		evaluated in vitro in duplicate by the Snyderman method	167
117	primers, and the sequencing was performed with DNA kit		using double-filter Boyden chambers (Neuroprobe, Bethesda,	168
118	big dye (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) in		MD, USA). The upper filter was a single-batch polycarbonate	169
119	the Techne Thermocycler.		Nucleopore filter (Nucleopore, Corp., Pleasanton, CA,	170
120	The DNA was transformed into competent DH10Bac		USA), pore-size 5 µm, for MP mobility studies. The	171
121	cells by transposition in the bacmid.		bottom filter was a single-batch cell-impermeable cellu-	172

173 lose nitrate filter, pore-size 8 μm (Sartorius GmbH,
 174 Göttingen, Germany). The upper compartment was filled
 175 with 5×10^5 MP suspended in 0.2 ml of Gey's albumin
 176 (Gey's-A). For random mobility evaluation, the bottom
 177 compartment contained 100 μl of the Gey's-A. For
 178 chemotaxis studies, the bottom compartment contained
 179 20 μl of the chemoattractant (ZAS) dissolved in 80 μl of
 180 Gey's-A.

181 The effect of the N protein upon the chemotaxis was
 182 studied; addition of 20 μl of this material, suspended in
 183 80 μl of Gey's-A, to the lower compartment of the Boyden
 184 chamber leaves the final volume at 100 μl .

185 Chambers were incubated for 90 min at 37°C in 5%
 186 CO₂. The upper and lower compartments were carefully
 187 emptied; the filters were removed, separated, and air-dried.
 188 The lower filters were fixed in 80% ethanol, stained with
 189 Harris hematoxylin/eosin, and mounted on glass slides,
 190 upper surface facing up, using a synthetic resin in 60%
 191 xylol (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).
 192 Uprmigration was counted by light microscopy at 400 \times
 193 using an oil-immersion objective. Two perpendicular
 194 diameters were counted on each filter (total in 10 fields
 195 per filter), and cell locomotion was scored as the average
 196 number of migrating MP per high-power field (400 \times).

197 *Oxidative burst* MPs were suspended in PBS in a final
 198 concentration of 1×10^6 cells/20 μl ; 20 μl of N protein or
 199 PBS was added and incubated for 15 min at 37°C. After
 200 the incubation, 700 μl of 10^{-6} M luminol (Eastman
 201 Kodak, Rochester, NY, USA) and 60 μl of opsonized
 202 zymosan (12.5 mg/ml) were added to the cellular suspen-
 203 sion. Cells treated with zymosan served as positive
 204 controls. Photon emission was detected in a labystemis
 205 Luminoskan chemiluminometer. Results were expressed
 206 as maximum peak of net relative light units per 10^6 MPs.

207 *Delayed hypersensitivity skin reactions to 1-chloro-2-4-*
 208 *dinitrobenzene* Ten individually caged short-hair, adult
 209 Harley guinea pigs were sensitized with a vesicant

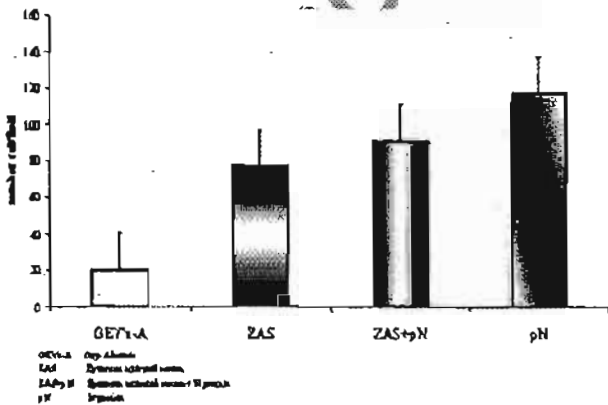


Fig. 1 Effect of the rabies virus N protein on chemotaxis of MPs. In vitro attraction of human MP chemotaxis by N protein recombinant, measured by number of cells/field, compared with PBS, ZAS, ZAS + pN. PBS Phosphate-buffered saline, ZAS zymosan-activated serum, pN N protein

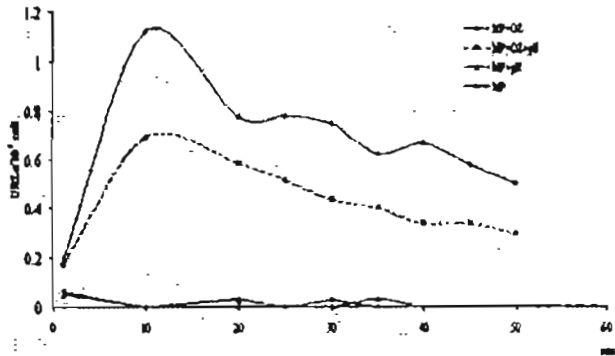


Fig. 2 Effect of the rabies virus N protein on respiratory burst of MPs. Inhibition of chemiluminescence in OZ activated human MP. • MP + OZ are activated human MP with PBS, ◐ MP + OZ + pN show the effect of N protein on OZ activated human MP, ◑ MP + pN are N protein and MP not activated, and ◒ MP are controls human MP alone. MP Mononuclear phagocytes, PBS phosphate-buffered saline, pN N protein, OZ opsonized zymosan

sensibilization dose of DNCB [10 mg/ml acetone/olive oil (4:1)] in 5-mm-diameter soaked Whatman no. 2 filter paper disks. Fourteen days later, identical paper disks, now soaked in DNCB diluted 1:200 in acetone/olive oil (4:1) with respect to the sensibilization dose, were applied for 24 h at four sites of the dorsal, carefully shaven skin of the animals, each site receiving now intradermally 0.05 ml of either 5, 27, or 54 mg/ml of recombinant N protein in PBS (pH 7.4) and PBS as control. Disks were removed after 24 h, and redness and indurations (>5 mm) were ascertained blindly at 48 h.

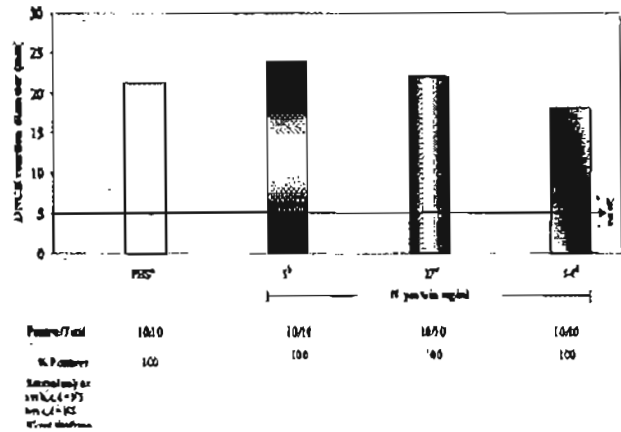


Fig. 3 Effect of the rabies virus N protein on delayed hypersensitivity to DNCB in guinea pigs. The delayed hypersensitivity was measured either in millimeter diameter of the reaction against the eliciting dose or as positive (+) or negative (-) reactions (cutoff=5 mm in diameter); 0.05-ml injections of 5, 27, 54 mg/ml of pN caused higher reactions when compared with PBS. DNCB 1-chloro-2-4-dinitrobenzene, PBS phosphate-buffered saline, pN N protein

221 Statistical analysis
 222 Results of in vitro protein N activity were analyzed by
 223 nonparametric Mann–Whitney and Kruskal–Wallis analy-
 224 sis of variance test (Altman 1991). Results of in vivo
 225 protein N activity were analyzed by Fisher exact test
 226 (Armitage et al. 2002).

227 **Results**

228 Effect of the N protein upon chemotaxis

229 There was a significant increase in the MP locomotion
 230 when compared with the control ($p < 0.05$). The N protein
 231 did not inhibit the chemotaxis of the MP under the effect of
 232 ZAS. (Fig. 1), and N protein per se stimulated the MP.

233 Effect of the N protein upon oxidative burst

234 The in vitro preexposure of MP to N protein inhibited the
 235 respiratory burst (43%) ($p < 0.05$) compared to control, with
 236 a peak emission at 10 min (Fig. 2).

237 Delayed hypersensitivity skin reactions
 238 to 1-chloro-2-4-dinitrobenzene

239 The N protein did not inhibit the reaction to DNCB when it
 240 was compared to DNCB/PBS measurements ($p > 0.05$)
 241 (Fig. 3).

242 **Discussion**

243 The rabies N protein enhances human MP chemotaxis,
 244 which leads us to suppose that this protein acts as an
 245 activator agent of the protein kinase C and behaves as a
 246 phorbol ester or as ionophore of calcium. The N protein
 247 acts on chemotaxis receptors which are typical G-protein-
 248 associated receptors that function according to different
 249 principle, whereas the phototherapeutic-keratectomy-asso-
 250 ciated receptors activate specific intracellular signaling
 251 proteins by phosphorylation, the α subunits of activated G-
 252 protein from complexes with them that exhibit changed
 253 enzymatic or binding activities (Klein 1997). The N protein
 254 can use similar or different ways of signal transduction to
 255 activate chemotaxis. On one hand, the N protein can
 256 increase zymosan effects on professional phagocytic cells,
 257 another mechanism can enable to stimulate signals through
 258 different receptors to evoke stimulation of second messen-
 259 gers that activate phosphorylation of certain proteins.
 260 However, the adjuvant effect of N protein (Lafon et al.
 261 1992), as well as its capacity to induce a cellular immune
 262 response (Astoul et al. 1996), has also been reported. The
 263 antigenic sites studied were linear and conformation-
 264 dependent (Goto et al. 2000). Our results suggest that the
 265 sequence of four amino acids present in MLIF, and which

are found in the N protein, cannot be not exposed in the
 secondary structure of the protein and therefore cannot
 have the expected biological effect, maybe because the
 antigenic sites are not exposed.

On the other hand, the N protein inhibits the respiratory
 burst of human MP. This inhibition also can be due to the
 receptor blockage (CD14), which is important for its
 response, or to the component translocation associated with
 the cytochrome b_{558} . There are reports (*Bordetella pertus-*
sis) about an inhibition of respiratory burst by AMPc
 (Klein 1997); however, this inhibition, no doubt, refers to
 the four amino acids that share the N protein with MLIF,
 since a synthetic construct (Met-Gln-Cys-Asn) did not
 cause inhibition (unpublished data). The inhibitory effect
 could be due to the complete N protein.

The nucleocapsid of rabies virus has been reported as a
 superantigen, specific for V β 8 human T lymphocytes,
 which binds to human leukocyte antigens class II and as a
 potent activator for human T lymphocytes in rabies vac-
 cines (Lafon et al. 1992). This activity may be responsible
 for the hypersensitivity observed in our results. Delayed
 hypersensitivity produced by the N protein is probably
 caused when a subsequent exposure to DNCB induces T_H
 cells secret cytokines responsible for the recruitment and
 activation of macrophages (80–90%) and other nonspecific
 inflammatory cells (Roitt 1991).

Unlike MLIF, recombinant N protein enhanced migra-
 tion of MP and DNCB reactions, although like MLIF, it
 inhibited the oxidative burst. The synthetic tetrapeptide
 (Met-Gln-Cys-Asn) with a sequence as that present in the
 N-protein fails to exhibit anti-inflammatory actions, while
 the tripeptide –Cys-Asn-Ser exhibits significant anti-
 inflammation activity. Thus, to display anti-inflammatory
 effects, either the entire MLIF peptide sequence has to be
 present or at least the ... Cys-Asn-Ser. Furthermore, the Ser
 residue—in particular the ... Cys-Asn-Ser acid terminal
 segment of the peptide—is critical for MLIF function. The
 scarce inflammatory reaction seen in rabies may result
 from causes other than N protein.

The GenBank reports other organisms that shared 100% of
 the sequence of MLIF in their genomes, like the sandfly fever
 virus which is transmitted by arthropods and affects man and
 has neurotropic effect (Liu et al. 2003). It is possible that the
 full sequence acts as an immunomodulator, favoring virus
 infection; this will be studied in the near future.

Acknowledgements In memoriam: our chief and professor Dr
 Roberto Kretschmer Schmid, dead March 22, 2005. Thanks to Lic
 Alfonso Magallón P. for the excellent artwork and Lic. Laura Nava of
 Vinculación Académica-Coplada de UAM-Xochimilco for her help
 This work was supported by grant from the Consejo Nacional de
 Ciencia y Tecnología (CONACYT) No. 34214B.

References

Altman DG (1991) Practical statistics for medical research. Chapman
 & Hall/CRC, London
 Armitage P, Berry G, Matthews JNS (2002) Statistical methods in
 medical research. Blackwell, Oxford

- 322 Astoul E, Lafage M, Lafon M (1996) Rabies superantigen as a V β T-
323 dependent. *J Exp Med* 183:1623–1634
- 324 Chomczynski P, Sacchi N (1987) Single-step method of RNA
325 isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform
326 extraction. *Anal Biochem* 162:156–159
- 327 Dietzschold B, Wang H, Rupprecht CE, Celis E, Tollis M, Ertl H,
328 Heber-Katz, Koprowski H (1987) Induction of protective
329 immunity against rabies by immunization with rabies virus
330 ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84:9165–9169
- 331 Giménez-Scherer JA, Rico G, Fernández J, Kretschmer RR (1987)
332 Inhibition of contact cutaneous delayed hypersensitivity reac-
333 tions to DNCB in guinea pigs by the monocyte locomotion
334 inhibitory factor (MLIF) produced by axenically grown
335 *Entamoeba histolytica*. *Arch Med Res* 28:237–238
- 336 Goto H, Minamoto N, Ito H, Ito N, Sugiyama M, Kinjo T, Kawai A
337 (2000) Mapping of epitopes and structural analysis of antigenic
338 sites in the nucleoprotein of rabies virus. *J Gen Virol* 81:119–127
- 339 Klein JAB (1997) *Immunology*. Blackwell, Oxford
- 340 Kretschmer RR, Collado ML, Pacheco MG, Salinas MC, López
341 OM, Lecuona M, Castro EM, Arellano J (1985) Inhibition of
342 human monocyte locomotion by products of axenically grown
343 *Entamoeba histolytica*. *Parasite Immunol* 7:527–543
- 344 Kretschmer RR, Rico G, Giménez JA (2001) A novel anti-
345 inflammatory oligopeptide produced by *Entamoeba histolytica*.
346 *Mol Biochem Parasitol* 112:201–209
- 347 Kucera LS, Myrvik QN (1985) *Fundamentals of medical virology*.
348 Lea & Febiger, Philadelphia
- Lafon M, Lafage M, Martinez-Arends A, Ramirez R, Vuillier F, 349
Charron D, Lotteau V, Scott-Algara D (1992) Evidence for a 350
viral superantigen in humans. *Nature* 358:507–508 351
- Liu DY, Tesh RB, Travassos Da Rosa AP, Peters CJ, Yang Z, Guzman 352
H, Xiao SY (2003) Phylogenetic relationship among members of 353
the genus *Phlebovirus* (Bunyaviridae) based on partial M segment 354
sequence analysis. *J Gen Virol* 84(Pt 2):465–473 355
- Mavrakīs M, Iseni F, Mazza C, Schoehn G, Ebel C, Gentzel M, 356
Franz T, Ruigrok RWH (2003) Isolation and characterization of 357
the rabies virus N^a-P complex produced in insect cells. 358
Virology 305:406–414 359
- Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H (1996) Laboratory 360
techniques in rabies. World Health Organization, Geneva 361
- Murphy FA, Gibbs EPJ, Horzinek MJ, Studdert MJ (1999) 362
Veterinary. Academic Press, San Diego 363
- National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2004) 364
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 365
- Perrin P, Joffret ML, Leclerc C, Oth D, Sureau P, Thibodeau L 366
(1988) Interleukin 2 increases protection against experimental 367
rabies. *Immunobiology* 177:199–209 368
- Rico G, Arellano J, Kretschmer RR (1998) The monocyte loco- 369
motion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica* does 370
not inhibit the locomotion of human eosinophils. *Parasitol Res* 371
84:522–523 372
- Roitt IM (1991) *Essential immunology*. Blackwell, London 373
- WHO (1995) *The world health report 1995—bridging the gaps*. 374
World Health Forum 16:377–385 375
- WHO/PAHO/UNESCO (1997) *Report of the consultation of experts 376*
on amoebiasis. Mexico City 377

UNCORRECTED PROOF



REVISTA VETERINARIA MEXICO

SR.(ES) DR.(ES)
ESTHER MORALES-MARTÍNEZ
GUADALUPE RICO-ROSILLO
JOSÉ LUIS GÓMEZ-OLIVARES
ÁLVARO AGUILAR-SETIÉN
P R E S E N T E

Estimados Doctores:

Informo a ustedes que su Artículo de revisión "Importancia inmunológica de la proteína N en la infección por el virus de la rabia", ha sido aceptado en principio para su publicación, en la Revista "Veterinaria-México".

Adjuntamos los comentarios que el Comité Editorial hizo a su Artículo, el cual agradeceremos a usted se sirva devolver debidamente corregido con un original y dos copias para una revisión final, en caso de no estar de acuerdo con algún comentario, remitir por escrito el motivo.

Sin otro particular y en espera de la devolución de su artículo lo antes posible, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Ciudad Universitaria, DF. 4 de mayo de 2005
DIRECTOR TÉCNICO DE LA REVISTA

MVZ. RAYMUNDO MARTÍNEZ PEÑA

NOTA: FAVOR DE DEVOLVER SU ARTÍCULO REVISADO POR NOSOTROS.

Enviar diskette de 3 1/2 en word p/windows de su estudio ya corregido sin ninguna otra información en el disco y notificar en qué programa están los cuadros, gráficas o figuras que existan en el estudio. Se informa a los autores que a partir del 2002, esta revista es publicada totalmente en versión bilingüe, (español e inglés) por lo que se deberá enviar todo manuscrito primeramente en español, preparado con base en las Instrucciones a los autores, para ser sometidos a consideración del Comité Editorial. El proceso de revisión será como hasta hoy. Los manuscritos ya aceptados deberán ser traducidos al inglés. Vet. Méx. contará con un equipo profesional para este fin, en el que podrán contactar los autores que así lo deseen, quienes cubrirán el costo de este trabajo. Aquellos que decidan enviar las dos versiones (español-inglés), podrán hacerlo una vez que su artículo haya sido aceptado.

Ccp Archivo

RMP*lgmm

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA U N A M
CIUDAD UNIVERSITARIA 04510, MEXICO, D F
56 22 58 75 56 22 59 18 FAX 56 22 59 18
Correo electrónico: imp@servidor.unam.mx