

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE BLV  
CON ELEMENTOS ANTISENTIDOS LIBRES Y  
ENCAPSULADOS EN LIPOSOMAS**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN  
BIOTECNOLOGIA**

**PRESENTA:  
MC. PABLO ZAPATA BENAVIDES**

**DIRECTORES DE TESIS:  
DRA. LAURA TREJO AVILA  
DR. REYES S. TAMEZ GUERRA**

**MONTERREY, N. L.**

**MAYO DE 1998**



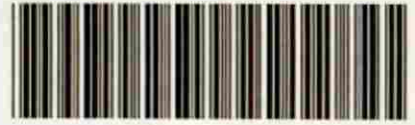
UNANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD  
QR375  
.Z3  
1998  
c.1



1080087093



# UANL

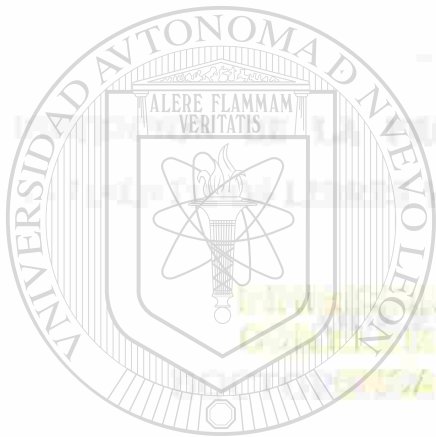
---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

®

MC. PABLO ZAPATA BENAVIDES  
PRESENTA:  
MC. PABLO ZAPATA BENAVIDES

DIRECTORES DE TESIS:  
DRA. LAURA TREJO AVILA  
DR. REYES S. TABEZ GUERRA

MONTERREY, N. L.

2017

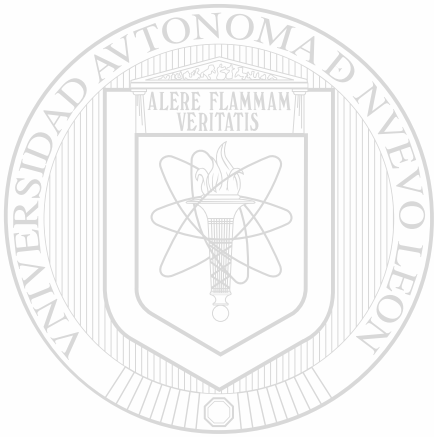


T

375

Z3

199



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE BLV CON ELEMENTOS  
ANTISENTIDOS LIBRES Y ENCAPSULADOS EN LIPOSOMAS**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN**

**BIOTECNOLOGIA**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN**

**PRESENTA**

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

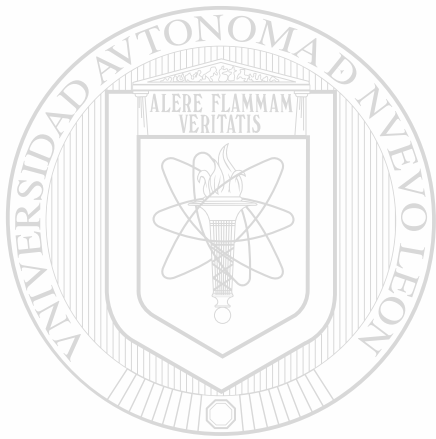
**MC. PABLO ZAPATA BENAVIDES**

**DIRECTORES DE TESIS : DRA. LAURA TREJO AVILA.**

**DR. REYES S. TAMEZ GUERRA.**

**MONTERREY, N.L.**

**MAYO DE 1998**



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**INHIBICIÓN DE LA PROLIFERACION DE BLV CON ELEMENTOS  
ANTISENTIDOS LIBRES Y ENCAPSULADOS EN LIPOSOMAS**

**COMISION DE EXAMEN**

**DRA. LAURA TREJO AVILA.  
PRESIDENTE**

**DR. JUAN MANUEL ALCOCER G.  
SECRETARIO**

**DR. REYES TAMEZ GUERRA  
VOCAL**

**DRA. CRISTINA RODRIGUEZ PADILLA.  
VOCAL**

**DR. LUIS GALAN WONG  
VOCAL**

**MONTERREY, N. L.**

**MAYO DE 1998**

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE BLV CON ELEMENTOS  
ANTISENTIDOS LIBRES Y ENCAPSULADOS EN LIPOSOMAS**

**COMISION DE APROBACION DE TESIS**

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. LAURA TREJO AVILA**

**DIRECTOR**

  
\_\_\_\_\_  
**DR. REYES TAMEZ GUERRA**

**CO-DIRECTOR**

  
\_\_\_\_\_  
**DRA. JULIA VERDE STAR**

**DIRECTORA DE DIV. DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**

**MONTERREY, N.L.**

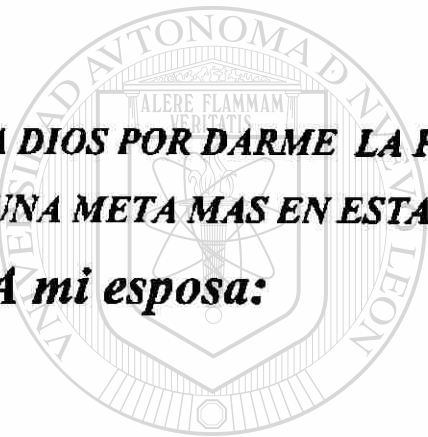
**MAYO DE 1998**

# DEDICATORIA

**A DIOS POR DARME LA FUERZA Y LA SABIDURA PARA LOGRAR  
UNA META MAS EN ESTA VIDA**

**A mi esposa:**

**MARIA ANTONIETA LARA RDZ. POR SU AMOR,  
MOTIVACION Y CONFIANZA PARA LOGRAR ESTA  
META.** DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UANL



## **AGRADECIMIENTOS**

**Agradezco el apoyo económico brindado al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y a la Dirección de Estudios de Postgrado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.**

**Mi mas sincero agradecimiento Dra. Laura Trejo Avila, Dra. Cristina Rdz. Padilla, Dr. Reyes S. Tamez Guerra, y al Dr. Juan Manuel Alcocer por su invaluable apoyo y asesoría para el desarrollo de esta tesis y con ello mi superación profesional y personal.**

**Agradezco a todo el personal del Laboratorio de Inmunología y Virología por su apoyo brindado.**

**Agradezco el apoyo a mis compañeros y amigos de trabajo del laboratorio de virología. Herminio, Sabino, Victoria , Angel, Victor y Reyes Dimas.**

**DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS**

**Agradezco a todos mis AMIGOS su confianza y cariño hacia mi.**

**Arturo Chavez, Gabriel del Leon, Ramiro Avalos, Silvia Treviño y Yolanda gutierrez .**



# INDICE

<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b>	I
<b>LISTA DE FIGURAS</b>	V
<b>LISTA DE TABLAS</b>	VII
<b>AREA DE TRABAJO</b>	VII
<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCION</b>	3
<b>ANTECEDENTES</b>	
I.- EPIDEMIOLOGIA	6
II.- CARACTERISTICAS DEL VIRUS	11
II.- TRANSCRIPTASA REVERSA ( R-T )	15
IV.- ELEMENTOS ANTISENTIDOS	18
V.- ADMINISTRACION DE LOS ANTISENTIDOS	22
<b>ORIGEN DE LOS REACTIVOS</b>	26
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	
I.- MODIFICACION Y CONSTRUCCION DE PLASMIDOS	
A) TRANSFORMACION	28
1.- FORMACION DE BACTERIAS CALCIO COMPETENTES	28
2.- TRANSFORMACION	29
B) MINIPREPARACION DE PLASMIDOS	29

<b>C) PRODUCCION DE PLASMIDOS A GRAN ESCALA</b>	<b>30</b>
<b>D) CLONACION</b>	<b>30</b>
1.-Corte y/o digestión de los plásmidos	30
2.- Electroforesis en gel de agarosa	30
3.- Purificación del plásmido digerido a partir de geles de agarosa	31
4.- Ligación	31
<b>II.- PRODUCCION DE ANTICUERPOS</b>	<b>32</b>
A) Esquema de inmunización	32
B) Purificación de IgG	33
C) Marcaje de la IgG	34
<b>III.- TRANSCRIPCION IN VITRO</b>	<b>36</b>
<b>IV.- PREPARACION DE LOS LIPOSOMAS</b>	<b>36</b>
<b>V.- CULTIVO DE CELULAS FLK-BLV</b>	<b>37</b>
A) Propagación	37
B) Producción de antígeno Gp-51.	38
<b>VI.- TRANSFECCION DE LAS CELULAS FLK-BLV</b>	<b>38</b>
A) Transfección con cloruro de calcio	38
B) Transfección con liposomas	39
<b>VII.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD</b>	
<b>β-GALACTOSIDASA EN LAS CELULAS FLK-BLV.</b>	<b>39</b>
<b>VIII.- EXTRACCION DE PROTEINAS.</b>	<b>40</b>
A) Metodo de trizol	40
B) Cuantificación de proteínas por el micrometodo de lowry.	41
<b>XI.- ENSAYO IMUNOLOGICO LIGADO A ENZIMA (ELISA)</b>	<b>42</b>
<b>X.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA</b>	<b>43</b>

A) Electroforesis:	43
B) Transferencia:	43
C) Inmunodetección	43
XI TRANSCRIPTASA REVERSA	44
A) Aislamiento viral	44
B) Ensayo de transcriptasa reversa	45

## **RESULTADOS**

### **I.- OPTIMIZACION DE CONDICIONES DE TRANSFECCION**

#### **CON LIPOSOMAS 47**

A) Marcaje con I <sup>131</sup>	
B) Marca con isotiocianato de fluoresceína	50

### **II.- ACTIVIDAD DE β-GALACTOSIDASA EN LIPOSOMAS**

#### **CON Y SIN ANTICUERPOS 52**

### **III.- CONSTRUCCION DE PLASMIDOS PARA LA SINTESIS**

#### **DE ANTISENTIDOS 55**

A) Construcción del plásmido 5-6.1	55
B) Construcción del plásmido 3-12a	58

### **IV.- EMPAQUETAMIENTO DEL RNA CON ESPERMIDINA**

#### **Y ENSAYOS DE PROTECCIÓN 61**

### **V.- INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE TRANSCRIPTASA**

#### **REVERSA POR RNA ANTISENTIDOS Y SENTIDO**

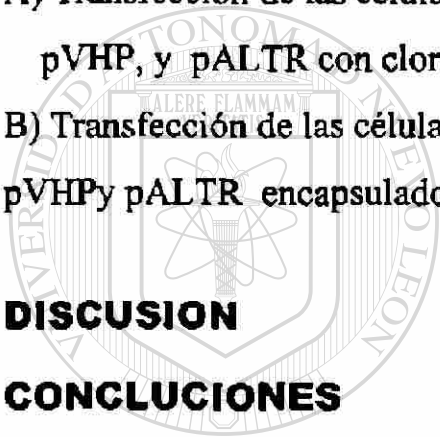
#### **CONTRA POL Y PX 63**

### **VI.- CONSTRUCCION DE PLASMIDOS PARA INCREMENTAR**

#### **LOS NIVELES DE ANTISENTIDOS CONTRA POL Y PX POR**

#### **TRANSFERENCIA DE GENES EN CÉLULAS FLK-BLV. 65**

A) Construcción de plásmidos para la transferencia de genes de BLV.	65
B) Construcción del plásmido pVHP para la transferencia del gen pol	66
C) construcción de plasmidos para la transferencia del gen pX y la secuencia LTR de blv.	68
<b>VII.- INHIBICION DE LA EXPRESION DE BLV POR TRANSFERENCIA DE GENES ANTISENTIDOS</b>	<b>72</b>
A) Transfección de las células FLK-BLV con los plásmidos pVA, pVHP, y pALTR con cloruro de calcio.	72
B) Transfección de las células FLK-BLV con los plásmidos pVA, pVHPy pALTR encapsulados en inmunoliposomas.	74
<b>DISCUSION</b>	<b>76</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>82</b>
<b>PERSPECTIVAS</b>	<b>83</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>84</b>
<b>APENDICE A</b>	<b>100</b>



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>DNA</b>	Acido Desoxiribunucleico
<b>EDTA</b>	Acido Etilén diamino-tetra-acético
<b>RNA</b>	Acido ribonucleico
<b>CO<sub>2</sub></b>	Bióxido de carbono
<b>BrE</b>	Bomuro de Etidio
<b>FLK-BLV</b>	Células de riñón de ternera fetal infectadas con BLV
<b>CHOL</b>	Colesterol
<b>c. p. m.</b>	Cuentas Por Minuto
<b>OD</b>	Densidad Optica
<b>dNTP</b>	Deoxinucleotidos trifosfato
<b>DEPC</b>	Dietilpirocarbonato
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTT</b>	Dithiotreitol
<b>SDS</b>	Duodecil sulfato de sodio
<b>TRE</b>	Elementos responsables de tax
<b>ELISA</b>	Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima
<b>FBP</b>	Factor de plasma que bloquea la expresión de BLV
<b>PC</b>	Fosfatidilcolina
<b>PE</b>	Fosfatidiletanolamina
<b>PS</b>	Fosfatidilserina
<b>PMSF</b>	Fenil-metil-fluorosulfonilo
<b>Gp51</b>	Glicoproteína de 51 kd
<b>Gp30</b>	Glicoproteína de 30 kd

<b>Gp70</b>	Glicoproteína de 70 kd
<b>g</b>	Gramos
<b>°C</b>	Grados Centígrados
<b>h</b>	Horas
<b>IA</b>	Inmunoadherencia
<b>IDAG</b>	Inmunodifusión en agar gel
<b>IET</b>	Inmunoelectrotransferencia
<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>IgG</b>	Inmunoglobulina G
<b>Kb</b>	Kilobases
<b>LP</b>	Linfocitosis persistente
<b>l</b>	Litros
<b>LTR</b>	Long terminal repeat
<b>Mg</b>	Magnesio
<b>min</b>	Minutos
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>µl</b>	microlitros
<b>µg</b>	microgramos
<b>mA</b>	miliamperes
<b>MEMC</b>	Medio esencial mínimo de crecimiento
<b>MENM</b>	Medio esencial mínimo de mantenimiento
<b>MENF</b>	Medio esencial mínimo de congelación
<b>RPMI</b>	Medio RPMI 1640
<b>MN</b>	Membrana de nitrocelulosa
<b>µ</b>	Micras

<b>nm</b>	Nanómetros
<b>ng</b>	nanogramos
<b>NV</b>	Neutralización Viral
<b>N</b>	Normal
<b>ORF</b>	Open reading from, marco de lectura abierta
<b>bp</b>	Pares de Bases
<b>PES</b>	Penicilina-Estreptomicina
<b>PM</b>	Peso Molecular
<b>PA</b>	Plasma Autólogo
<b>PEG</b>	Polietilengicol
<b>pH</b>	Potencial de Hidrógeno
<b>p24</b>	Proteína de 23 kd
<b>p15</b>	Proteína de 15 kd
<b>p12</b>	Proteína de 12 kd
<b>PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa
<b>RPM</b>	Revoluciones por minuto
<b>Rnasa</b>	Ribonucleasa
<b>RT-PCR</b>	Reacción en Cadena de la Polimerasa con productos de la Transcriptasa Reversa
<b>PBS</b>	Solución balanceada de fosfatos
<b>SA</b>	Suero Autólogo
<b>SFB</b>	Suero Fetal Bovino
<b>TBE</b>	Solución balanceada Tris-boratos
<b>TBS</b>	Solución balanceada de tris
<b>GAG</b>	Secuencia génica de BLV que codifica las proteínas del core



<b>ENV</b>	Secuencia génica de BLV que codifica las proteínas de envoltura
<b>POL</b>	Secuencia génica de BLV que codifica la proteína transcriptasa reversa
<b>Región pX</b>	Secuencia génica de BLV que codifica las proteínas transactivadoras tax y rex
<b>TE</b>	Solución balanceada Tris-EDTA
<b>TS</b>	Solución balanceada tris-salina
<b>TC</b>	Solución Tris-calcio
<b>RT</b>	Transcriptasa Reversa
<b>Taq</b>	Thermophilus acuaticus
<b>Tris</b>	Tris-hidroxi-metil aminometano
<b>UV</b>	Ultra violeta
<b>MLV</b>	Vesículas Multilamelares
<b>ULV</b>	Vesículas Unilamelares
<b>LUV</b>	Vesículas Unilamelares Grandes
<b>BLV</b>	Virus de la leucosis bovina
<b>HIV</b>	Virus de la Inmunodeficiencia Humana
<b>HTLV-I/II</b>	Virus linfotrópico de células T de humano
<b>STLV</b>	Virus linfotrópico de células T de simio
<b>V</b>	Volts

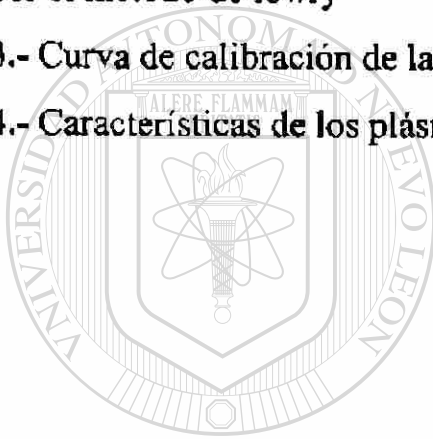
## LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PAGINA
1.- Estructura del Virus de la Leucosis Bovina.	11
2.- Mapa de BLV cepa BELGIAN	12
3.- Purificación de IgG	65
4.- Purificación de los anticuerpos marcados con I <sup>131</sup>	48
5.- Purificación de los inmuno-liposomas marcados con I <sup>131</sup> .	49
6.- Migración electroforética de los inmunoliposomas marcados con I <sup>131</sup> .	49
7.- Calibración de la columna de sephadex G25 para la purificación de anticuerpos marcados con fluroceína.	51
8.- Purificación de IgG bovina.	51
9.- Células fluorescentes por los inmunoliposomas marcados con fluroceína	52
10.- Mapa del plásmido pSV-β-galactosidasa	53
11.- Actividad de β-galactosidasa en los extractos de células FLK-BLV	54
12.- Mapa del Plásmido original 5-6	56
13.- Liberación del fragmento PstI del plásmido 5-6.	56
14.- Construcción de plásmido 5-6.	57
15.- Patrón electroforético de los plásmidos 5-6.1 y 5-6	58
16.- Mapa del Plásmido original 3-12	59
17.- Liberación del fragmento EcoRI del plásmido 3-12.	59
18.- Construcción del plásmido 3-12 A	60
19.- Empaquetamiento del RNA con la espermidina	61

<b>20.- Ensayo de protección por concentración de espermidina.</b>	<b>62</b>
<b>21.- Ensayo de protección del RNA con espermidina a diferentes tiempos.</b>	<b>62</b>
<b>22.- Actividad de la Transcriptasa reversa en células FLK-BLV tratadas con RNA sentido y antisentido.</b>	<b>64</b>
<b>23.- Inhibición de la expresión de la transcriptasa reversa en células FLK-BLV tratadas con RNA sentido y antisentido.</b>	<b>64</b>
<b>24.- Mapa del plásmido pCDNA3</b>	<b>65</b>
<b>25.- Digestión del plásmido 5-6 con EcoRI-XhoI</b>	<b>66</b>
<b>26.- Diagrama de construcción del Plásmido pVHP</b>	<b>67</b>
<b>27.- Digestión del plásmido 3-12 con EcoRI y XbaI</b>	<b>68</b>
<b>28.- Diagrama de construcción de los Plásmidos pALTR y pVA</b>	<b>69</b>
<b>29.- Patrón electroforético de los plásmidos pALTR y pVA.</b>	<b>70</b>
<b>30.- Corrimiento electroforético de los plásmidos originales</b>	<b>70</b>
<b>31.- Actividad de la transcriptasa reversa en las células FLK-BLV a las 72 horas después de la transfección.</b>	<b>73</b>
<b>32.- Inhibición de la producción de partículas vírales a las 72 horas después de la transfección</b>	<b>73</b>
<b>33.- Inhibición de la producción de partículas vírales a las 72 horas después de la transfección</b>	<b>74</b>
<b>33.-Actividad de la R-T y expresión de proteínas virales virales en FLK-BLV transfectadas con inmunoliposomas</b>	<b>76</b>
<b>34.- mapa de restricción BLV</b>	<b>76</b>

## LISTA DE TABLAS

TABLAS	PAGINAS
1.- Esquema de inmunización de los ratones Balb/c para la producción de anti-Gp51 en fluido ascítico	32
2.- Curva de calibración para la determinación de proteínas por el método de lowry	39
3.- Curva de calibración de la R-T	42
4.- Características de los plásmidos originales y modificados	70



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## **AREA DE TRABAJO:**

**LABORATORIO DE INMUNOLOGIA Y  
VIROLOGIA, DEL DEPARTAMENTO DE  
MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA.**

**FAC. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS U.A.N.L.**

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN

El virus de la leucosis bovina (BLV) es un retrovirus tipo C que infecta principalmente al ganado lechero adulto mayor de 2 años, en menor proporción al ganado de carne y en forma experimental a ovejas y conejos, BLV presenta mucha similitud con el virus linfotrópico de células T humano ( HTLV ). La similitud se refleja principalmente en la organización genética, replicación viral, infección y patología, lo cual lo hace un excelente modelo de estudio para las infecciones retrovirales que son hoy en día una de las principales plagas que afectan a la población. Continuamente se están buscando diferentes modelos animales que nos permitan mejorar las estrategias profilácticas y terapéuticas de estas infecciones retrovirales las cuales son asociadas con alteraciones neoplásicas y disfunción del sistema inmune. En este trabajo utilizamos elementos antisentido que tratan de bloquear la expresión de los genes virales y como consecuencia la producción de partículas virales, los elementos antisentido son una buena herramienta que hoy en día van en ascenso y que reprime la expresión de una secuencia específica basada principalmente en el apareamiento<sup>®</sup> de bases del modelo de Watson y Crick, sin embargo los elementos antisentidos son muy sensibles a la acción de nucleasas que se encuentran en el citoplasma celular o en el suero del medio de cultivo o de los animales, por lo que se han buscado mejores estrategias de transporte y protección, se están usando ampliamente liposomas como vehículo de transporte de oligonucleótidos antisentido o DNA plasmídico y elementos policationicos como las poliaminas que empaquetan el ácido nucleico protegiéndolo de la degradación por nucleasas.

En este trabajo se construyeron 2 formulaciones de inmunoliposomas con anticuerpos anti-Gp51 para dirigirlos específicamente hacia las células blanco que están infectadas, los inmunoliposomas demostraron tener más capacidad de transformación con el plásmido pSV $\beta$ -galactosidasa que los liposomas que no se le acoplaron anticuerpos. Los inmunoliposomas constituidos de fosfatidilcolina, ácido fosfatídico y colesterol en una relación molar 5:4:1 fueron más efectivos en la transformación que los inmunoliposomas construidos con fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y colesterol en una relación molar 6:2:2. Los asRNA construidos por transcripción "in vitro" bajo el promotor de T7 polimerasa y empaquetados en liposomas produjeron una inhibición del 16 % con los RNA antisentidos del gen pol y un 13 % con los antisentidos para la región pX, sin embargo el porcentaje de inhibición se incrementó al transfectar las células con las construcciones pVHP y pVA que contienen la secuencia para el gen pol y para la región pX en dirección antisentido bajo el control del promotor de citomegalovirus en la estructura del plásmido pcDNA3, estos fueron transfectados por el método de cloruro de calcio y con inmunoliposomas, la inhibición de la actividad de la transcriptasa reversa para pVHP fue de 23.3 % por el método de CaCl<sub>2</sub> y de 29.5 por inmunoliposomas, para pVA fue de 43.6% por CaCl<sub>2</sub> y 49% por inmunoliposomas, por lo tanto los RNA antisentidos producidos por la célula son mas efectivos para inhibir la expresión viral que los RNA producidos "in vitro", y los RNA dirigidos contra la región pX fueron más efectivos que los dirigidos sobre la región pol, En este trabajo tuvimos buenos niveles de transfección en un sistema con características que permitirán su aplicación 'in vivo' con bajos niveles de toxicidad, debido a que nosotros queremos observar el efecto de los inmunoliposomas sin potencializadores de la transfección.



## INTRODUCCION

El cáncer y las alteraciones inmunológicas son ocasionadas por múltiples factores, los agentes virales juegan un papel importante en una gran cantidad de estas alteraciones, principalmente los miembros de la familia retroviridae, que se caracterizan por poseer la enzima transcriptasa reversa y un RNA genómico que constituye los lócus genéticos *LTR-gag-pol-env-LTR*, la ubicación y el número de genes de regulación así como la presencia o ausencia de oncogenes virales dependen del retrovirus que se trate. En la mayoría de los retrovirus que conducen a neoplasias (oncovirus), su potencial oncológico se deriva de la expresión de los oncogenes virales o de la alteración de genes celulares por la inserción del genoma viral entre estos, sin embargo los retrovirus que conducen a leucemias/linfomas después de un largo período latente presentan un modo diferente de transformación por la acción de productos de genes reguladores del virus sobre genes celulares. Por otra parte los retrovirus que producen inmunosupresión involucran una acción directa de las células linfoides y macrófagos, por otra parte la formación de complejos inmunes que inducen a fenómenos citocidas y de autoinmunidad.

En los últimos 15 años ha sido posible poner de manifiesto en humanos a un grupo de retrovirus exógenos T linfotrópicos ( HIV y HTLV-I/II ), las patologías relacionadas contra estos virus son uno de los principales problemas de salud en el mundo. En 1980 fue aislado el primer retrovirus humano denominado Virus Linfotrópico T Humano ( HTLV-I ) por Poieaz y

col. de un paciente con linfoma cutáneo de células T, esta neoplasia se caracteriza por producir una proliferación no controlada de células T, no es una pandemia, sin embargo se encuentran áreas de alta endemicidad para el virus en Japón, Africa, el Caribe y SudAmérica. En 1983 el grupo de Montagnier aisló el HIV ( Virus de la Inmunodeficiencia Humana) de un paciente con SIDA cuyas siglas significan Síndrome de Inmuno Deficiencia Adquirida, la cual es una pandemia considerada como la mayor plaga de la segunda mitad del siglo XX.

Estos dos grupos de retrovirus apesar de pertenecer a dos subfamilias diferentes ( HTLV-I/II a la subfamilia Oncovirinae y HIV a la subfamilia Lentivirinae ) tienen muchas características en común como es el tropismo por los receptores CD4 de los linfocitos T, una organización muy similar ( aunque la secuencia nucleotídica presenta homología distante ), además presentan rutas comunes de transmisión como es el contacto sexual, transfusión sanguínea, contacto directo a torrente sanguíneo con agujas contaminadas y equipo terapéutico que acarrea linfocitos contaminados.

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se han realizado grandes esfuerzos en el control de los virus y tratamiento de enfermedades asociadas a estos. La mayoría de los tratamientos virales están dirigidos contra la Trascriptasa Reversa ( R-T ) que tiene como función principal convertir el genoma RNA viral a DNA para la integración permanente del provirus en el genoma de las células infectadas. Se han utilizado algunos compuestos químicos como el AZT (azidotimidina) y dideoxinozina que interrumpen el ciclo viral sin embargo tienen un alto costo y efectos colaterales importantes, también se han

utilizado elementos antisentidos como los oligonucleótidos y RNA que bloquean la transcripción y traducción del gen *pol*.

La necesidad de modelos de estudio para el sida, cáncer e infecciones retrovirales en general, han llevado en la última década a diversos grupos de investigadores al aislamiento de lentivirus y oncovirus en varias especies animales, los cuales han sido considerados como agentes causales de síndromes de la inmunodeficiencia adquirida semejante a sida y leucemias linfomas .

Estas especies animales representan un útil modelo para el entendimiento de los mecanismos de infección y alteraciones patológicas, sin embargo la utilidad más importante de estos modelos es el desarrollo de métodos profilácticos, terapia antiviral y la creación de vacunas que pretenden resolver el grave problema de salud pública que representan los retrovirus en la actualidad.

— BLV comparte numerosas características patológicas, estructura génica y estrategias de expresión a HTLV-1/II, además ambos ( junto con Virus linfotrópico de células T de simio. STLV ) poseen una característica única que los distingue de los otros retrovirus, el gen *pX*, sin embargo se diferencia por su rango de huésped con respecto a la especie y las células que infectan, HTLV-1/II son asociados a leucemias/linfomas de células T humanas mientras que BLV esta asociado a leucemias/linfomas de las células B de bovinos.

En este trabajo nosotros pretendemos utilizar el virus de la leucosis bovina ( BLV ) como modelo para el estudio de la inhibición de la transcripción de la R-T y la región reguladora *pX* ( transactivadora)

# **ANTECEDENTES**

## **I.-EPIDEMIOLOGIA**

La leucosis bovina enzoótica es una enfermedad linfoproliferativa persistente causada por el Virus de la Leucosis Bovina ( BLV ) un retrovirus morfológicamente similar a los virus tipo C causantes de leucemias en otras especies ( 66 ). El virus causante de esta enfermedad esta agrupado en la familia Oncovirinae ya que posee características genéticas, morfológicas y patológicas similares a otros virus de este grupo ( 67, 68 ). Afecta principalmente al ganado lechero de 4 a 8 años de edad y en menor proporción al ganado productor de carne y en forma experimental a ovejas y cabras (26, 35), causando la neoplasia más maligna del ganado bovino ( 74 ).

BLV fue aislado e identificado en 1969 por J.M. Miller y colaboradores, a partir de vacas con linfosarcoma y confirmado y estudiado posteriormente por otros grupos de investigadores lo que originó el desarrollo de técnicas serológicas y virológicas sensibles y específicas ( 67 ).

De todos los animales infectados únicamente una pequeña fracción ( menos del 10 % ) desarrolla linfosarcoma y el resto de los animales se mantiene como portadores asintomáticos o desarrollan una linfocitosis persistente (PL) ( 74 ), que es considerada por algunos autores como una etapa preleucémica ( 20, 39 ) que da inicio a una respuesta linfoproliferativa, sin embargo muchos animales PL nunca desarrollan neoplasias, por lo que es considerada en general como una respuesta benigna de la infección ( 74 ).

Fuertes evidencias sugieren que el desarrollo de linfosarcoma y/o PL dependen de la constitución genética del hospedero (40 ).

La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en la población de ganado bovino en Estados Unidos, Japón, Gran Bretaña, Venezuela, Italia, Francia y otros ( 8, 24 ).

En los Estados Unidos de Norteamérica, a lo menos 20 % de la población adulta lechera son positivos a BLV, llegando a ser en algunas regiones económicamente muy importante ya que hay hatos con prevalencia de hasta un 90 %. En México se han realizado pocos estudios sobre la incidencia de la enfermedad sin embargo estos indican una prevalencia similar a la de otros países tanto en ganado lechero como en ganado de carne. En el noreste de la República Mexicana hemos encontrado una prevalencia de 16.30 % en ganado lechero mayor de 2 años y 1.95 % en ganado de carne mayor de 2 años, sin embargo hemos encontrado hatos lecheros con una seroprevalencia de hasta 69.84 % (95).

Transmisión: las pruebas seroepidemiológicas señalan que la transmisión es tanto vertical como horizontal muy semejante a las vías utilizadas por los retrovirus humanos ( HTLV-I/II y HIV ), la transmisión de BLV al ganado es através de linfocitos infectados de un animal a otro principalmente por el uso de material contaminado con sangre de animales positivos, en el manejo del hato y por transmisión sexual ( 34, 62, 63 ).

Diagnóstico: el diagnóstico es establecido mediante exámenes clínicos, hematológicos, necrópsicos, serológicos y moleculares. La mayoría de las técnicas empleadas hoy en día se basan en la detección de anticuerpos

específicos contra el virus, la prueba de inmunodifusión en agar gel ( IDAG ) es la prueba oficial aprobada por el Consejo de la Comunidad Europea para la detección y el control de BLV . Hasta fechas recientes, los antígenos usados en la detección de BLV por la prueba de IDAG eran el antígeno dual ( Gp51y p24 ) y p24, sin embargo el antígeno Gp51 concentrado y purificado a partir de líneas celulares infectadas con BLV ha demostrado tener una mayor sensibilidad ( 6, 18, 20, 26, 40, 52 ). Los métodos estándar para el diagnóstico de las infecciones retrovirales como es la serología, cultivo de células, microscopía electrónica y la hibridación carecen de sensibilidad en las fases tempranas de la enfermedad, sin embargo con la técnica de reacción en cadena de la polimerasa ( PCR ) es posible detectar una sola célula infectada (56, 80).

Como se mencionó anteriormente el virus de la leucosis bovina (BLV) es el agente etiológico de la forma denominada leucosis enzoótica bovina caracterizada por una linfocitosis persistente y el desarrollo de linfomas de células B después de un cierto período de latencia, sin embargo recientemente se ha encontrado el provirus integrado en subpoblaciones de linfocitos T ( T cooperadores y T citotóxicos/supresores ) quizá en ellos se presenta un fenómeno similar al que presenta el gen *pX* de HTLV-I incrementando la actividad de algunas linfocinas ( R-IL2 ) que son involucradas en la regulación de la proliferación linfocítica conduciendo a un proceso leucemogénico ( 82 ).

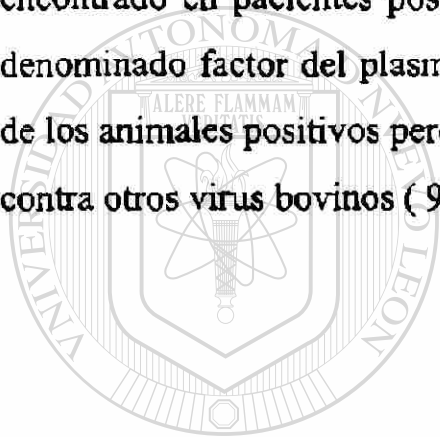
El BLV es un retrovirus exógeno, ya que los estudios de hibridación han demostrado que secuencias de DNA proviral se encuentran en los tejidos tumorales y no son detectados en DNA de bovinos normales ( 26 ).

El virus de la leucosis bovina y el virus linfotrópico T humano ( HTLV-I/II ) y de simio ( STLV-I ) comparten numerosas características de infección, patología, así como una estructura genética similar y una estrategia común de expresión génica, además poseen el gen *pX* como una característica distintiva de los otros retrovirus, se integran fortuitamente en el genoma del hospedero, no poseen oncogenes pero sus productos por sí mismos conducen a malignidad después de un largo período de latencia ( 44 ).

En infecciones persistentes el virus es recuperado de células mononucleares de sangre periférica después de que ha sido cultivado durante un período corto en presencia de ciertos mitógenos que estimulan la producción de partículas virales ( 9, 44, 53 ), sin embargo los estudios de hibridación molecular fracasan para detectar el RNA viral de los linfocitos infectados antes de cultivo por lo tanto el virus no es expresado en niveles detectables "in vivo" ( 40 ), además anticuerpos contra proteínas de BLV y proteínas virales se encuentran en cantidades pequeñas en circulación no detectables por métodos convencionales. Por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en productos de la transcriptasa inversa (RT-PCR) se han observado distintos patrones de transcripción de BLV en diferentes estados de la enfermedad, el RNA mensajero completo y el gen *ENV* son encontrados en portadores asintomáticos y disminuyen en animales PL, mientras que el gen *TAX/PX* se encuentra en altos niveles en los tres estados



de la enfermedad por lo que estos resultados sugieren que "in vivo" el genoma de BLV es reprimido en sus niveles de transcripción para proteínas estructurales ( 39 ). Gupta et al en 1984 aislaron y caracterizaron una proteína de 150 Kd, no inmunoglobulina capaz de controlar la transcripción del virus, limitando la producción de partículas virales (31) y recientemente se ha encontrado que este factor afecta principalmente la expresión de los genes pol y pX en las células FLK-BLV, ésta se encontró presente únicamente en el plasma ( y no en el suero ) de animales seropositivos, posteriormente fue encontrado en pacientes positivos al virus HTLV-I ( 88). El factor ha sido denominado factor del plasma que bloquea a BLV, detectado en la mayoría de los animales positivos pero no en los animales seronegativos, y no protege contra otros virus bovinos ( 94 ).



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



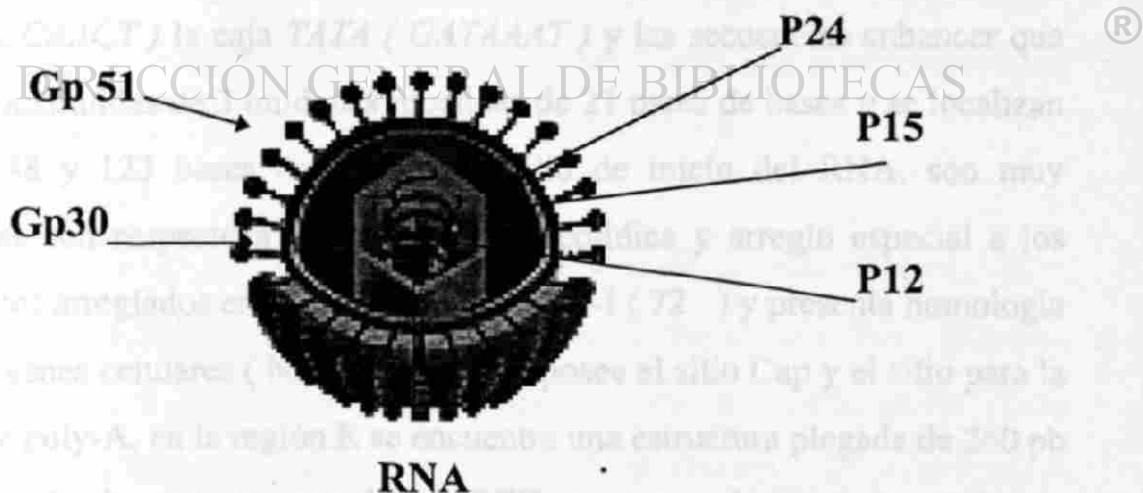
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## II.- CARACTERISTICAS DEL VIRUS

Los retrovirus poseen un genoma diploide de RNA de polaridad positiva, además de la transcriptasa reversa la cual permite la síntesis del DNA viral que se integra al DNA cromosomal del hospedero, perpetuándose así mientras viva la célula afectada.

BLV esta compuesto por una bicapa lipídica que contiene dos glicoproteínas incrustadas, Gp51 y Gp30 que juegan un papel importante en la infectividad del huésped. El core está constituido por proteínas altamente básicas P24, P15 y P12, dentro del core se encuentra la transcriptasa reversa que tiene un requerimiento absoluto de Mg y el RNA genómico (Fig.1) (73).

**FIGURA 1.-** Estructura del virus de la leucosis bovina.



El RNA viral está constituido por 8,714 nucleótidos formado por los siguientes locus genéticos ( 18 ): *5LTR-gag-prot-pol-env-px-3LTR* (Fig.2)

**FIGURA 2.** Mapa de BLV Belgian



Los *LTR* ( Long Terminal Repeat ) están constituidos por 530 pb (pares de bases) y flanqueados por 6 pb repetidos de DNA celular, poseen las regiones *U3--R--U5*. La región *U3'* contiene los promotores transcripcionales *CAT* ( *CCAACT* ) la caja *TATA* ( *GATAAAT* ) y las secuencias enhancer que están constituidas de 3 unidades repetidas de 21 pares de bases y se localizan entre 148 y 123 bases río arriba del sitio de inicio del RNA, son muy similares con respecto a la secuencia nucleotídica y arreglo especial a los elementos arreglados en los *LTR* de los HTLV-I ( 72 ) y presenta homología a otros genes celulares ( *NFKB* ). Además posee el sitio Cap y el sitio para la señal de poly-A, en la región R se encuentra una estructura plegada de 260 pb denominada elemento responsable de *REV* que separa el sitio de la señal poly A, ésta última se encuentra localizada en la región *U5'*. Inmediatamente

después de LTR 5' hay una pequeña *secuencia* de 18 pb que contiene un sitio de unión para la RNAt<sup>Pro</sup> que sirve como “primer” para la transcripción reversa de BLV . En el otro extremo el LTR tiene un fragmento de polipurina que sirve para la síntesis de RNA.

Los *LTR* juegan un papel importante en la integración del DNA viral, en la replicación y en la transcripción así como en los procesos de transformación celular cuyas acciones son ejercidas por los elementos promotores y enhancer que incrementan la eficiencia transcripcional de genes virales y celulares. Estos tienen una homología de más de 50 % a HTLV-I en la región R indicando una relación evolutiva, probablemente ésta estructura esta involucrada en las características biológicas similares entre los dos virus ( 17, 18, 19, 72 ).

El gen *gag* está constituido por 1,179 nucleótidos y codifica para las proteínas internas del core, sintetiza un solo precursor con un P.M. de 45 kd, el orden de las proteínas dentro del precursor es NH<sub>2</sub>-p24-p15- p12-COOH. Las p15 y p24 de 190 y 215 aminoácidos respectivamente son las proteínas que constituyen el core y la p12 de 69 aminoácidos se une al ácido nucleico viral, ésta tiene secuencias duplicadas de cisteína ( 94 ).

El gen de la proteasa viral se extiende a partir del nucleótido 1,548 al 2,132 iniciando 49 nucleótidos río arriba hacia el gen *gag*, presenta homología con el gen de la proteasa murina y puede ser clasificada como una proteinasa aspártica puesto que es similar a un dominio de la proteinasa aspártica, es muy probable que la proteasa viral sea una proteína dimérica

que actúa en los procesos de ensamblamiento viral que son requeridos para la infección ( 73 ).

El gen *pol* codifica el precursor que da origen a la transcriptasa reversa, una poliproteína de 852 aminoácidos que contiene determinantes del gen *gag* y gen *pol*, traslapándose en 500 pb con el gen *gag*, ( posición 2317-4875), éste precursor es de 95 Kd dando origen a a la transcriptasa reversa de 70 Kd y a una endonucleasa de 32 Kd, el gen *pol* es el más conservado de los tres genes retrovirales, la homología en los aminoácidos de la porción carboxilo terminal entre BLV y HTLV es aproximadamente de 45 % ( 68 ).

El gen *env* se extiende del nucleótido 4,820 al 6,368 y codifica para 515 aminoácidos que dan origen a dos proteínas de envoltura glicosiladas la Gp51 y la Gp30 ( 73 ).

— La Gp51 es una glicoproteína de superficie que contiene 8 sitios parcialmente glicosilados y es ampliamente utilizada en las pruebas serológicas ( 52, 53). La Gp30 es una glicoproteína transmembranal que contiene dos sitios hidrofóbicos y dos secuencias altamente glicosiladas ( 73 ).

El gen *pX* está localizado entre el gen *env* y el 3' *LTR* y codifica dos proteínas que regulan la expresión viral, una de 38 Kd (Tax) transactivadora, que activa los promotores virales y celulares, y una de 18 Kd (Rev) que estabiliza el RNA mensajero viral, esta es una fosfoproteína nuclear. Estas proteínas reguladoras de trans-activación provienen de un transcrito por un

proceso de maduración doble ( 51 ). Se ha demostrado por PCR, transcripción constante de *tax* y *rev* "in vivo" en bovinos y ovinos asintomáticos y con neoplasias linfocíticas infectados con el virus. Estos genes son muy similares en BLV y HTLV por lo que BLV se puede usar como modelo para el entendimiento de la expresión y los efectos transcripcionales en promotores virales y celulares inducidos por HTLV ( 69,72 , 73, 74 ).

Los bajos niveles de expresión de los genes estructurales y de regulación génica puede ser una estrategia del virus para evadir la vigilancia inmunológica y mantenerse en forma persistente y en bajos niveles de infección.

### III.- TRANSCRIPTASA REVERSA ( R-T )

La Transcriptasa reversa es una enzima multifuncional, DNA polimerasa dependiente de RNA o DNA y posee actividad RNasa H, emplea RNA o DNA como templete produciendo híbridos RNA-DNA o productos dúplex DNA, la actividad RNasa H es requerida para la degradación del templete de RNA, removiendo el RNA polipurina positivo y el RNAt por corte endonucleotídico (42).

La R-T en BLV o HTLV-I es una proteína poco estudiada sin embargo, el gen *pol* es altamente conservado en la mayoría de los retrovirus por lo que podríamos pensar que la mayoría de las R-T son muy similares

.Una de las R-T más estudiadas es la del virus de HIV, es un heterodímero inicialmente procesado del producto gen *pol* como un polipéptido de 66 Kd que contiene los dominios *pol* y RNasa H , constituido por las subunidades p66 y p51, la p51 es una versión troncada en la porción carboxilo terminal de la p66 producida por la acción de la proteasa viral que divide entre los aminoácidos 440 y 441, el heterodímero p66 y p51 tiene únicamente un sitio *pol*, un sitio RNasa y un sitio de unión a RNAt.

En HIV la RT cataliza la síntesis de RNA iniciando en el RNA  $t^{Lys}$  que se encuentra en el extremo 3' parcialmente desplegado y forma 18 pares de bases de dúplex con el sitio de unión del iniciador (primer) del RNA viral, mientras que en HIV la transcriptasa reversa requiere RNAt<sup>Lys</sup>, la de HTLV-I requiere RNAt<sup>Tre</sup>, la de BLV requiere RNA  $t^{Pro}$  y la de E. coli requiere un RNAt<sup>Gln</sup> ( 42, 72 ).

Descripción de la estructura de RT.- La subunidad p66 esta constituida por 5 subdominios plegados separados, que tienen cierto parecido anatómico a la mano derecha, la RNasa H y 4 subdominios de *pol* que son dedos, palma, pulgar y conexión, estas cuatro subunidades, la palma y la conexión estan constituidas de 5 hojas  $\beta$  y 2 hélices alfa, el pulgar es constituido principalmente por un paquete de 4 hélices aparentemente de péptidos no relacionadas que incluye dímeros de la proteína ROP la cual se une al RNA, el dominio que constituye los dedos contiene una mezcla de hojas  $\beta$  y 3 alfa hélice. La conformación de p51 es diferente a la de p66. El heterodímero de HIV presenta una depresión que corre entre el sitio activo de la RNasa H en

la parte inferior derecha donde se localizan los iones metálicos divalentes y el sitio activo de *pol* en la superficie superior izquierda donde se localiza la aspargina 185 y 186. En esta depresión es donde se realiza la síntesis de DNA usando como copia el RNA viral, en este proceso el RNA templete es degradado por la RNasa H de 16 a 18 nucleótidos río abajo de la síntesis, así la síntesis del producto dúplex RNA-DNA la cual es presumiblemente deformada, puede ser conducida entre los dos sitios activos con el extremo 3' del templete contactando con los metales divalentes de la RNasa H y el extremo 3' de la hebra "primer" cerca de la secuencia DD. Posiblemente el papel de la p51 es de unir el RNA al complejo para que se lleve a cabo la síntesis de DNA ( 42 ).

La especificidad del sustrato puede ser modificada por cambio del ión divalente magnesio (  $Mg_2$  ) por manganeso (  $Mn_2$  ) como es el caso del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) y el del HIV que en presencia de  $Mn_2$ , un catión que permite a la polimerasa adicionar ribonucleótidos a un iniciador en una reacción dependiente de templete, estos cambios inducidos pueden explicar la incorporación de ribonucleótidos en vez de desoxiribonucleótidos en otros virus como el virus del sarcoma murino ( 46 ).

La RNA polimerasa ha sido utilizada como blanco por la mayoría de las drogas antivirales tratando de inhibir la replicación viral, en la mayoría de los casos los inhibidores de R-T son nucleósidos análogos que son convertidos a trifosfatos por las enzimas celulares y que actúan como terminadores de la cadena. El AZT ( nucleósido análogo de la



azidotimidina ), y otras drogas antivirales presentan un impacto positivo en la calidad de vida y supervivencia del paciente infectado con HIV aunque éste compuesto presenta beneficios, muchos pacientes resultan intolerantes a la droga después de una terapia prolongada y sufren deterioro clínico (95). Además se ha observado en estos pacientes con terapia prolongada mutaciones en el gen pol del virus que le permite ser resistente a la droga . Se han utilizado otras drogas antivirales como las dipiridodiazepinonas (23), dideoxinozina (did) (58), K-3HPA-23 y K2-suramin (32) con efectos similares al AZT (96).

En la actualidad se están realizando grandes esfuerzos para el control y terapia de las enfermedades retrovirales, uno de los objetivos para el control es bloquear los procesos de producción y ensamblamiento viral utilizando oligonucleótidos análogos o elementos antisentidos dirigidos principalmente contra la transcriptasa reversa ( 4 ).

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
**IV.- ELEMENTOS ANTISENTIDOS**

Basado en la especificidad del apareamiento de bases del modelo de Watson y Crick se ha intentado usar elementos antisentidos ( RNA y oligonucleótidos ) en la terapia de enfermedades humanas. La utilización de estos elementos antisentidos en la farmacoterapia es una herramienta completamente nueva que se encuentra en los pasos preliminares y está siendo utilizada ampliamente “in vitro” como inhibidor de la sobre-

expresión de oncogenes celulares, ( 73, 92 ) en alteraciones neoplásicas y en el control de la expresión de los virus como citomegalovirus ( 5 ), herpes simple ( 10 ), encefalitis ( 63 ) y hepatitis B ( 64 ).

#### A).- RNA ANTISENTIDO

El RNA antisentido, es una copia complementaria al gen o a un fragmento del gen que se desea reprimir, su administración actúa bloqueando los procesos de maduración y de traducción del RNA mensajero. En las aplicaciones biológicas y terapéuticas de los ácidos nucleicos antisentidos es necesario identificar el sitio específico de las regiones blanco del RNA celular o viral, lo cual puede ser auxiliado con un análisis computacional (78 ). Una forma de selección de los RNA antisentidos es a través de un método de hibridación rápida, el grado de formación de la doble cadena híbrida entre el RNA antisentido y el RNA complementario “in vitro” se correlaciona con la eficiencia del RNA antisentido “in vivo” ( 70 ).

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los RNA antisentidos han sido utilizados principalmente en el bloqueo de la transcripción del HIV, en los genes *Tat* y *R-T*. Sczakiel y col. observaron la inhibición de la replicación de HIV con una expresión intracelular estable de un RNA antisentido en la línea celular Jurkat ( línea de células T linfoides ) dirigidos sobre los genes *tat* y *rev*, logrando una inhibición del 97 % durante las 2 primeras semanas post-infección (77). Mientras que Tuerk y col. encontraron un RNA antisentido pseudoconocido

con alta afinidad que tiene la capacidad de inhibir la transcriptasa reversa de HIV pero no otras polimerasas ( 88 ).

Un posible acercamiento para el control de BLV fue desarrollado por el efecto de los RNA antisentidos para bloquear la transcripción viral, Borisenko y colaboradores usaron el plásmido recombinante *pAGR* capaz de codificar para un RNA antisentido que tiene como blanco la región *R-U5* (147- 342 nucleótidos ) de los *LTR* del genoma viral, éste condujo a una efectiva inhibición "in vitro" de la replicación de BLV hasta de un 95 % ( 6 ). Murovska y col. observaron el efecto del RNA antisentido contra BLV en cultivo de células FLK-BLV infectadas permanentemente con el BLV, ellos obtuvieron construcciones bajo el control de varios promotores que permitieron la síntesis de RNA antisentido contra el gen *pX*, en las células transfectadas, y se midieron varios parámetros como actividad transcriptasa reversa, radioinmunoensayo competitivo para p24, conteo de partículas virales en membrana de agar y la tumorigenicidad en nódulos de rata, observando una inhibición de la replicación viral mayor con antisentidos contra la región LTR y una reducción de masa tumoral mayor cuando se usaron antisentidos contra la región pX que contra la región LTR ( 59 ).

## B).- OLIGONUCLEOTIDOS ANTISENTIDO

Los oligonucleótidos antisentidos son una herramienta altamente específica para el tratamiento de las enfermedades humanas como las

enfermedades virales y el cáncer, el mecanismo de acción de los oligonucleótidos antisentido es muy similar a los RNA antisentidos que inhiben los procesos de traducción, maduración y transcripción ( 61 ). La eficiencia de los oligos puede ser incrementada por la modificación de estos como fosforotioatos, metilfosfonatos y oligonucleótidos alfa ( 45, 81 ), hay 6 criterios para obtener mejores resultados que son: 1) fácil preparación, 2) estabilidad en vivo, 3) capacidad de entrar a las células blanco, 4) capacidad de ser retenidos en las células blanco, 5) capacidad de interactuar con los blancos celulares, 6) capacidad de interactuar de manera no específica con otras macromoléculas (81). La autoestabilidad de los oligos es incrementada con la formación de una estructura plegada en el extremo 3' que incrementa la resistencia a la degradación por DNA polimerasa I y suero fetal bovino (3,84).

Boiziau y col. observaron la inhibición de la transcriptasa reversa del virus de la mieloblastosis aviar y el virus de la leucemia murina moloney con un oligonucleótido antisentido que se une al RNA templete aproximadamente a 100 nucleótidos del extremo 3' del sitio iniciador, el RNA fue truncado en el nivel del dúplex RNA por los oligos antisentidos durante la transcripción reversa (3). Lisiewicz-J y col. simulando las condiciones "in vivo" de infección por HIV, evaluaron la eficiencia del tratamiento con oligonucleótidos durante un tiempo prolongado logrando bloquear la expresión del virus con oligonucleótidos dirigidos a diferentes regiones del RNAm de R-T a una concentración de 1  $\mu$ M ( 77 ) .

Además de la utilización de RNA antisentidos se han utilizado oligonucleótidos antisentido que inhiben la traducción del mensajero *pX* en reticulocitos lisados de conejo, los oligonucleótidos dirigidos hacia el extremo 5' de *TAX* reducen la traducción del RNA en un 45 al 59 % ( 11 ).

## V.- ADMINISTRACION DE LOS ANTISENTIDOS

En la mayoría de los trabajos realizados con RNA antisentidos se han utilizado plásmidos que albergan a el gen que se desea reprimir bajo la regulación de un promotor que se localiza en sentido inverso a la expresión normal (55), también se han utilizado retrovirus como acarreadores de antisentido, ambos han sido introducidos en cultivo de células con el método de precipitación de fosfato de calcio (50).

Los oligos pueden ser administrados "in vivo" por vías tópicas, sin embargo nuevos métodos están bajo estudio. Se han realizado estudios buscando la estabilidad de los elementos antisentidos por lo que se han examinado los órganos de animales tratados con fosforotriatos de 20 mer en busca de la distribución, estabilidad, y toxicidad de los oligonucleótidos los cuales fueron administrados por diferentes vías, encontrándose que el hígado retiene la más alta cantidad de oligos ( 1.3-2 % del total de la inyección ) en un pico de tiempo de 10- 30 min, la administración de los oligonucleótidos a través de la inyección fue de 5mg/kg, presumiblemente se produjo degradación de los oligos por la acción de la 3' exonucleasa (27).

Los liposomas han sido utilizados desde mediados de los 70s como un sistema de acarreadores de drogas, están compuestos por una o más bicapas lipídicas concéntricas que rodean un compartimiento acuoso, en el que atrapan drogas solubles en agua mientras que los agentes lipofílicos son atrapados entre la bicapa lipídica (38). Las aplicaciones de los liposomas son basadas en el hecho de que estos pueden llegar a ciertos tipos de células o tejidos que algunas drogas o acarreadores no pueden llegar, además protege contra las acciones nocivas de la droga por su lenta liberación y protege a la droga o ácido nucleico de los mecanismos de degradación en suero o a nivel celular, los liposomas son clasificados de acuerdo al tamaño, número de bicapas concéntricas y composición lipídica.

-Vesículas multilaminares (MLV). Están constituidas por varias capas concéntricas de lípidos y su tamaño oscila entre los 500-3000 nm con un coeficiente de encapsulamiento del 2 al 50 %.

-Vesículas unilamelares grandes (LUM). Son vesículas unilamelares con un rango de 200 a 1000 nm de diámetro, y tiene una capacidad de encapsulamiento de más del 50 %, estos son formados a partir de los MLV por extrucciones repetidas en filtros de policarbonato

-Vesículas unilamelares pequeñas (SUM) Tienen un diámetro de 30 nm y se obtienen por sonicación, sin embargo su diámetro pequeño lo hace impracticable para encapsular drogas polares.

Los liposomas conteniendo análogos de distearoylfosfolidiletanolamina son endocitados por linfocitos y fagocitos, con esta formulación se encapsularon oligonucleótidos antisentido y en dirección normal de 20 mer del extremo 5' del sitio aceptor del proceso de maduración de HIV en una concentración de 140 nM, inhibiendo la

producción de p24 en un 84 % en linfocitos de sangre periférica infectados con el virus silvestre, el tratamiento también redujo el antígeno intracelular en un 71% (84) . Ropert y col. compararon la eficiencia de 2 compuestos de liposomas cuyas formulaciones fueron pH sensible y pH insensible, los oligómeros encapsulados en liposomas pH sensitivos fueron más activos que los encapsulados con liposomas pH no sensitivos, probablemente el pH sensitivo puede evitar la degradación de los oligos por los lisosomas (71). Svinnarchuk y col. observaron buena actividad anti-HIV de oligonucleótidos antisentidos conjugados con grupos lipofílicos, estructuras lineales anfipáticas y el colesterol fueron acoplados al fosfato de los oligonucleótidos via glicina, probablemente la conjugación con los grupos lipofílicos estimulan la unión de los oligonucleótidos a la célula y los protege de las nucleasas celulares, estos oligonucleótidos fueron dirigidos a una secuencia conservada del *gen env* viral (83).

Nuevas modificaciones han surgido en la tecnología de los liposomas, han sido modificados ciertos grupos en los lípidos por inclusión de cargas negativas para incrementar la eficiencia de encapsulamiento y prolongar su estancia "in vivo" (25). Los liposomas más ampliamente utilizados en la transfección de DNA en cultivo de células y en animales, son constituidos de lípidos con carga positiva que atrapan al DNA formando un complejo hidrofóbico, con una frecuencia de transfección mayor de 80% e incluso algunos lípidos como el Dimtyldioctadecyl-ammonium bromide (DDBA) tienen transfecciones del 95% (91) .

Con la finalidad de prolongar la estancia de los liposomas en circulación han sido cubiertos con altas concentraciones de polímeros hidrofóbicos como el polyetilenglicol (41), el complejo cationico plásmido-liposomas con



espermidina o polyetilenglicol son estable por meses a 4 °C con altos niveles de transfección "in vivo". (41)

Los inmunoliposomas han permitido la aplicación de los liposomas como herramienta diagnóstica o un excelente indicador de dirección de las células blanco. El acoplamiento de los ligandos a los liposomas se realizan por modificaciones químicas con N-hidroxilsuccinimidyl-3-(2-piridildithio)-propionato (SPDP) el cual se reduce a 3-(2-piridildithio)-propionato (PDP) derivando la proteína-PDP que subsecuentemente es reducida a proteína-SH con ditiotritol y este mismo procedimiento se realiza con la fosfatidyletanolamina (FE) para formar FE-PDP, lo cual permite el acoplamiento de la proteína -SH. Otras formas de acoplamiento es por la acción del glutaraldehído y absorción directa (76). Por el método de sonicación la IgG puede unir de un 4 a un 40 % a los fosfolípidos, la IgG humana y de ratón son las inmunoglobulinas que se unen en mayor proporción 35% y 32 % respectivamente (36). Weisman et.al observaron que liposomas cubiertos con inmunoglobulinas son más eficientes para el transporte de enzimas que los que no están cubiertos en una orden de magnitud en células deficientes de lisosomas (89).



## **ORIGEN DE LOS REACTIVOS**

**SIGMA CHEMICAL COMPANY.-** Agarosa, ácido etilen-diamino-tetra-acético, azul de coomassie, acrilamida, albúmina de huevo, alfa-D-manosidasa, bicarbonato de sodio, bromuro de etidio, cloruro de sodio, conjugado anti-IgG de bovino-peroxidasa, diaminobenzidina, dimetilsulfoxido, dietilpirocarbonato, duodecil-sulfato de sodio, fenol-folin-ciocalteu, fenol, ficoll-histopaque, glicina, lactoalbúmina, medio esencial mínimo, NP-40, penicilina, proteína A sepharosa, proteinasa K, rojo ponceau, RPMI-1640, sulfato de estreptomycin, sulfato de amonio, tris-HCl, tween-20, tfl-DNA-polimerasa, UREA.

**LABORATORIOS PISA, S.A. DE C.V.-**Heparina sódica.

**BOEHRINGER MANNHEIM** Kit de Transcripción , Kit de Transcriptasa Reversa

**PRODUCTOS QUIMICOS MONTERREY, S.A.-** Acido acético, Acido clorhidrico, cloroformo, etanol, formaldeído, isopropanol, peróxido de hidrógeno, metanol.

**FARMACIA .-** Proteína A sefarosa, sílica proteína A, sefarosa Con A.

**BIOEXPORT.-** Suero fetal bovino.

**GIBCO BRL LIFE TECHNOLOGIES.-** Ditiotreitól, solución amortiguadora para transcriptasa reversa.

## **MATERIAL BIOLÓGICO**

1. La línea celular FLK-BLV fue gentilmente donada por el Dr. M.J. Van der Maaten del Laboratorio Nacional de Enfermedad Animal, del Departamento de Agricultura de Ames, Iowa, Estados Unidos.
2. Los plásmidos 3-12 y 5-6 fueron gentilmente donado por la DRA. Katarin Rake de la Universidad de David California.
3. El plásmido pcDNA3 fue gentilmente donado por el DR. Juan Manuel Alcocer del laboratorio de Inmunología y Virología de la facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## MATERIAL Y METODOS

### I.- MODIFICACION Y CONSTRUCCION DE PLASMIDOS

#### A) TRANSFORMACION

Transformación de la cepa DH5 $\alpha$  de E.coli con los plásmidos originales ( 5-6, 3-12, pCDNA3, pRS $\beta$ gal) plásmidos modificados para la transcripción “in vitro” bajo los promotores SP6 y T7 ( 5-6.1, 3-12.A ) y los plásmidos construidos para transcripción “in vivo” bajo el promotor de citomegalovirus (ALTR, VA y VHP).

#### 1.- FORMACION DE BACTERIAS CALCIO COMPETENTES

Se realizó la activación de E.coli. inoculando una “azada” en 5 ml de caldo Luria Bertania (LB), se incubó toda la noche a 37°C con agitación constante.

Se tomó 100  $\mu$ l del tubo anterior y se inocularon en un tubo con 5 ml de caldo LB y se incubó durante 4 horas a 37°C. Se centrifugaron 3 ml del caldo LB en un tubo eppendorf en una microcentrifuga (eppendorf), se deshechó el sobrenadante y la pastilla se disolvió en 1.2 ml de CaCl<sub>2</sub> frío, se incubó durante 20 minutos en hielo y se centrifugó durante 2 minutos, se deshechó el sobrenadante y la pastilla se disolvió en 50  $\mu$ l de CaCl<sub>2</sub>.

## 2.- TRANSFORMACION

En un tubo eppendorf se colocaron 5  $\mu$ l de plásmidos en solución amortiguadora de Tris EDTA (TE), a una concentración de 1 $\mu$ g/ $\mu$ l y 20  $\mu$ l de bacterias calcio competentes, se incubaron en hielo 1 hora con agitación suave, se produjo un “shock” de calor a 37°C durante 1 minuto en baño maría, después de esta incubación se adicionaron 200  $\mu$ l de caldo LB sin antibiótico y se incubó a 37°C por 20 minutos. Se vertió el contenido en 2 cajas Petri con agar LB con antibiótico (100 $\mu$ g/ml de ampicilina) y se incubaron toda la noche a 37°C, posteriormente se seleccionaron la clonas.

### B) MINIPREPARACION DE PLASMIDOS

Para verificar la transformación de E. coli se realizó la minipreparación de plásmidos:

Las clonas seleccionadas se inocularon en 1.5 ml de medio LB con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina y se incubaron toda la noche a 37°C con agitación lenta, el medio de cultivo se centrifugó durante 2 minutos, la pastilla obtenida fue resuspendida con 200  $\mu$ l de solución amortiguadora de tris cloruro de sodio (TS), se adicionó 200  $\mu$ l de solución amortiguadora de lisis (ELT), se agitó suavemente y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se incubó por 15 minutos a 70°C. La mezcla se centrifugó por 30 minutos a temperatura ambiente, se tomó el sobrenadante y se transfirió a un tubo eppendorff, se adicionó un volumen de polietilenglicol, se agitó suavemente por inversión, se incubó la mezcla por 20 minutos y

posteriormente se centrifugó durante 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió con 30  $\mu$ l de solución amortiguadora TE .

### **C) PRODUCCION DE PLASMIDOS A GRAN ESCALA**

#### **1) Crecimiento de bacterias.**

Se transfirieron 20 ml de cultivo de bacterias transformadas que creció durante toda la noche, un litro de medio LB con antibiótico se incubó a 37°C con agitación constante hasta alcanzar una absorbancia de 0.3-0.4 a 600 nm.

#### **2) Lisis celular.**

Después de la incubación de las 14 horas el medio de cultivo se centrifugo y el paquete celular se lisó con una solución de 0.2 mg de lisozima por ml con agitación suave y hielo durante 5 min., posteriormente se le adiciono EDTA y tritón X.

### **D) CLONACION**

#### **1.- Corte y/o digestión de los plásmidos con enzima de restricción.**

En un tubo eppendorf se adicionó 2  $\mu$ l del plásmido (1 $\mu$ g), 1 $\mu$ l de solución amortiguadora 10X específico de la enzima, 1  $\mu$ l de enzima y 6  $\mu$ l de agua miliQ. Se incubó la mezcla por una hora a 37°C y para verificar la digestión se realizó un corrimiento electroforetico en un gel de agarosa analitico.

#### 4.- Electroforesis en gel de agarosa analítico

Se prepararon 25 ml de agarosa al 0.8% en solución amortiguadora de tris boratos y EDTA (TBE), se le agregó 5 µl de bromuro de etidio (10µg/ml). Se vació la agarosa en el molde con el peine para hacer pozos con una capacidad de 15 µl, se gelificó y se colocó el gel en la cámara de electroforesis, se cubrió con solución balanceada TBE. Se tomó 3 µl de muestra y se mezcló con 1 µl de jugo azul 6X, se depositó la mezcla en un pozo del gel y el corrimiento se realizó a 100 volts constantes por 50 minutos, el gel se observó en el transiluminador de luz ultravioleta y fue fotografiado.

\* Gel de agarosa preparativo.- La agarosa se vació en el molde con el peine para un solo pozo con capacidad de 100 µl aproximadamente. Se tomaron 50-75 µl de muestra y se mezclaron con 8-12.5 µl de azul 6X, se depositó toda la mezcla en el pozo

#### 2.- Purificación del plásmido digerido a partir de geles de agarosa

Se corrió un gel de agarosa preparativo, se cortaron las bandas del fragmento deseado de DNA del gel de agarosa y se colocaron en un tubo eppendorff, posteriormente se le añadió 3 volúmenes de solución "stock" de yoduro de sodio 6 molar, el tubo se incubó por 5 minutos a 45-55°C, se adicionó 5 µl de GLASSMILK por 5 µg de DNA o menos, se homogenizó y se incubó en hielo por 5 minutos, la mezcla fue centrifugada a 5000 rpm por 5 segundos, se desechó el sobrenadante, la pastilla fue lavada con 300 µl de NEW WASH frío, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en agua bidestilada, se incubó a 55°C por 3 minutos, se centrifugó y se recuperó el sobrenadante,

**\*\*Para agarosa con TBE se adicionó medio volumen de modificador de TBE y 4.5 volúmenes de solución “stock”.**

### **3.-Ligación**

El plásmido que fue digerido se puso en contacto con el fragmento génico de interés y se circularizó por acción de la enzima ligasa que forma un enlace fosfodiéster entre el extremo 5' y 3'. En un tubo eppendorff se colocó, 1µl de solución amortiguadora de ligación, 1µl de la enzima ligasa T4, 4 µl de plásmido digerido y 4 µl del fragmento a clonar en una relación molar de 1:2, la mezcla se incubó a 4°C durante 16 horas, después de este período se inactivó la enzima a 60°C por 10 minutos.



## **II.- PRODUCCION DE ANTICUERPOS**

La producción de anticuerpos se realizó en ratones Balb/C, para eso se siguió el siguiente esquema de inmunización:

### **A) Esquema de inmunización**

Se administró por vía intraperitoneal 0.5 ml de pristane, a los 13 días se administró 100 mg de GP51 con adyuvante completo, posteriormente a los 20 y 27 días se administró 100 y 50 mg respectivamente de proteína sin adyuvante, a los 34 días se inocularon 10<sup>6</sup> células X-63, (esta descripción se muestra en la tabla No. 1), posteriormente a los 15 días se realizó una

prueba de ELISA dot para determinar la concentración de anticuerpos en fluido ascítico y finalmente se realizó la extracción del mismo.

**Tabla 1.** Esquema de inmunización de los ratones Balb/c para la producción de anti-Gp51 en fluido ascítico.

<b>DIA</b>	<b>D O S I S</b>	<b>VIA</b>
<b>0</b>	<b>0.5 ml de pristane</b>	<b>i.p.</b>
<b>13</b>	<b>100 µg de ag-BLV/1 vol ACF*</b>	<b>i.p.</b>
<b>20</b>	<b>100 µg de ag-BLV</b>	<b>i.p.</b>
<b>27</b>	<b>500 µg de ag-BLV</b>	<b>i.p.</b>
<b>34</b>	<b>1X10<sup>6</sup> células X-63</b>	<b>i.p.</b>
<b>38</b>	<b>Cosecha de líquido ascítico</b>	<b>i.p.</b>

### **B) Purificación de IgG**

Se realizó la purificación de IgG de fluido ascítico de ratón y de sueros de bovinos.

Se sangraron 9 animales seropositivos a BLV por venopunción y se obtuvieron 20 ml de sangre de cada uno en un tubo vacutainer, se centrifugó la sangre y se separó el suero de cada muestra, (se realizó una prueba de inmunoadherencia para verificar seropositividad a



BLV). Se mezclaron los sueros y la IgG fue purificada por precipitación de gamaglobulinas con un volumen de sulfato de amonio ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) saturado, esta precipitación se realizó 3 veces, posteriormente el paquete fue resuspendido en un décimo del volumen original con solución balanceada de fosfatos (PBS) y dializado por 24 horas contra solución de boratos ( para eliminar sulfatos ). La IgG se purificó en una columna sílica con proteína "A" sepharosa la cual fue lavada con solución A ( ver apéndice A ) para eliminar proteínas inespecíficas y eluida con solución B ( figura No. 2 ). Se cuantificó la elución obtenida con el método de microlowry y se guardó en congelación hasta el momento de su uso.



**Figura 3.** Purificación de IgG en una columna de proteína "A" sepharosa

### **C) Marcaje de la IgG**

El marcaje de los anticuerpos se realizó para observar si estos se unían a los liposomas y si el complejo liposoma-anticuerpo llegaba a las células blanco, se marcaron con isotiocianato de fluoresceína y Iodo radioactivo. En un tubo eppendorf se adicionaron 10 mg de anticuerpos y 5  $\mu$ g de isotiocianato de fluoresceína, la mezcla se incubó toda la noche a 4°C, se eliminó el exceso de fluoresceína no unida a los anticuerpos a través de una columna de sephadex G-25 (Fig.3), para observar su pureza se corrió un gel de acrilamida al 12 %, se tiñó con azul de coomassie, posteriormente se observó el gel a través del transiluminador de luz ultravioleta (Fig.8).

En el marcaje con iodo radioactivo, se prepararon 1 mg de Iodogen disuelto en cloroformo y se distribuyó en alicuotas de 100  $\mu$ g, se dejó en una desecadora con vacío hasta que se evaporó el cloroformo y formó una película uniforme de Iodogen, posteriormente tomamos un tubo con 100  $\mu$ g de iodogen y le adicionamos 100  $\mu$ l de proteína en una concentración de 1 mg/ml y 500  $\mu$ Ci de I<sup>131</sup>, se incubó 15 minutos con agitación suave, posteriormente se le adicionó 0.25M de NaI en un volumen de 25  $\mu$ l y se eliminó la marca que se unió a los anticuerpos, pasando la mezcla a través de una columna de sephadex G50 (Fig. 5.).

### III.- TRANSCRIPCION IN VITRO

Los RNA antisentidos “pol” y “px” fueron obtenidos por transcripción de los genes pol y pX en los plásmidos 5-6 y 3-12 ( figura No. 12 y 16), se usó el kit “ SP6/T7 Transcription of Boehringer Mannheim”. Se linearizaron los plásmidos 5-6 y 3-12 con Eco RI y HIND III respectivamente. El DNA se incubó con una mezcla de 3 µl de ATP, GTP, UTP y CTP, 2 µl de solución amortiguadora 10X, 4 µl de agua tridestilada estéril y 2 µl de RNA polimerasa T7. La mezcla se incubó 60 minutos a 37°C, el DNA fue removido por la adición directa de 2 µl de DNasa I libre de RNA, se incubó por 15 minutos a 37°C, los transcritos fueron analizados por electroforesis desnaturalizante y cuantificado en un espectrofotometro BECKMAN DU 650 a 260 mm..

### IV.- PREPARACION DE LOS LIPOSOMAS

La formulación de los liposomas fue la siguiente: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y colesterol en una relación molar de 6:2:2 y fosfatidilcolina, ácido fosfátidico y colesterol en una relación molar de 5:4:1, todos los lipidos fueron disueltos con cloroformo y posteriormente evaporados con un flujo de nitrógeno líquido para producir la película de lipidos, posteriormente se le agregaron los antisentidos y se sometió a una agitación vigorosa en un vortex durante 45 minutos y se obtuvieron liposomas multilamelares. Para

producir vesículas unilamelares de tamaño uniforme se utilizó un extruder ( lipex, biomembranes, Vancouver, Canadá ) con membranas de policarbonato con poros de 100 nm de diámetro, los liposomas se pasaron por el extruder por 5-10 veces bajo una presión de nitrógeno entre 200 y 500 mmHg. Una vez obtenidos los liposomas se colocaron en viales ( a una concentración de 1  $\mu$ mol de lípido ) y se almacenaron a una temperatura de 4°C hasta el momento de su uso.

## V.- CULTIVO DE CELULAS FLK-BLV

### A.- Propagación.

Se descongeló ( Nitrógeno líquido -196 °C ) un criotubo con la línea celular FLK-BLV ( células de riñón de ternera fetal infectada con VLB ) a baño maría a 37°C y se sembraron en MEMC ( medio esencial mínimo de crecimiento ) suplementado con 8% de SFB ( suero fetal bovino ), 100 U/ml de penicilina y 100  $\mu$ g/ml de estreptomycin, 2% de bicarbonato de sodio y 0.25% de lactoalbúmina, usando frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup>, se incubaron a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO<sub>2</sub>, se realizaron subcultivos en una relación de 1:5 semanalmente usando 1 ml de EDTA ( ácido etilendiaminotetracético ) al 0.05% para la disgregación de la monocapa celular, se incubaron 2 minutos, posteriormente se eliminó el EDTA y se golpeó en un costado del frasco, se lavaron por centrifugación a 1500 RPM por 5 minutos con 5 ml de MEMC, finalmente las células fueron resuspendidas en 5 ml de MEMC y distribuidas 1 ml de la suspensión celular por cada caja y se agregaron 4 ml de MEMC suplementado a cada una.

## **B.- Producción de antígeno Gp-51.**

A cajas con 90% de confluencia celular se les retiró el MEMC y se restituyó por MEMM ( medio esencial mínimo de mantenimiento ) suplementado con 5% de SFB, se colectó el medio después de 3-4 días del cultivo ( la colecta del medio se realizó repetidas veces hasta obtener aproximadamente 2 litros ) y se precipitó con sulfato de amonio, el precipitado se disolvió con PBS con una décima parte del volumen original del sobrenadante y se pasó a través de una columna conteniendo sepharosa-ConA. Los lavados se realizaron con PBS y se eluyó con una solución de alfa-D-manosidasa al 0.1 M. La solución obtenida de la elución ( conteniendo las glicoproteínas) fue utilizada para la pruebas de inmunodifusión en agar gel y ELISA.

## **VI.- TRANSFECCION DE LAS CELULAS FLK-BLV**

### **A) Transfección con cloruro de calcio**

Para la transfección con cloruro de calcio se utilizó 0.5  $\mu$ g de DNA del plásmido y 4.5  $\mu$ g de DNA de esperma de salmón como acarreador y se le adicionó 16.6  $\mu$ l de cloruro de calcio al 2.5 molar, se aforó a 250  $\mu$ l con solución amortiguadora TE, esta solución se adicionó suavemente en 166  $\mu$ l de solución amortiguadora HBS 2X, se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, una vez terminado este período de tiempo se vertió gota a gota sobre la monocapa de las células FLK-BLV con 70 % de confluencia crecidas en una caja de 12 cm<sup>2</sup> de superficie, la placa se incubó por 24 horas a 37°C

con 5 % de CO<sub>2</sub> , se lavó 2 veces con PBS, se adicionó medio fresco y se incubó de nuevo por 24 horas.

### **B) Transfección con liposomas**

Células FLK-BLV crecidas al 70 % de confluencia en cajas de cultivo de 12 cm<sup>2</sup> se lavaron con PBS 1X , se agregó 1 µmol de inmunoliposomas en 200 µl de solución amortiguadora TE, las cajas se incubaron por 1 hora a 37°C, los liposomas fueron retirados y las células se lavaron 2 veces con PBS, se les adicionó 5 ml de medio fresco y se incubaron por 48 horas a 37°C.

## **VI.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD β-GALACTOSIDASA EN LAS CELULAS FLK-BLV.**

Las células FLK-BLV que fueron transfectadas con el plásmido pRS-β-gal se lavaron con 1 ml de solución TD, se cosecharon con esta solución y se centrifugaron a 7,000 r.p.m., la pastilla se resuspendió en 200 µl de solución TGD, las células se lisaron con 3 ciclos de congelación-descongelación y fueron centrifugadas, el sobrenadante se llevó a un tubo eppendorf y se adicionaron 800 µl de PBS y 200 µl de o-nitro fenil galactosido (ONPG) a una concentración de 4 mg/ml en PBS, se incubó 1h. a 37°C y la reacción se interrumpió con 0.5 ml de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, se midió la hidrólisis de la reacción a 420nm.

## VII.-EXTRACCION DE PROTEINAS

### A.- METODO DE TRIZOL

Las células FLK-BLV fueron lisadas con 1 ml de trizol (TRIZOL REAGENT™) e incubadas por 5 minutos a temperatura ambiente, se pasaron a un tubo eppendorf, posteriormente se adicionó 200 µl de cloroformo y se agitó vigorosamente por 15 segundos, se incubó por 2 ó 3 minutos y se centrifugó a 12,000 r.p.m. por 5 minutos a 4°C. Después de la centrifugación la mezcla se separó en una fase inferior roja que es la fase orgánica ( fenol cloroformo ), en una interfase y en una fase superior acuosa. Se tomó la fase inferior roja y se adicionó 1 ml de isopropanol, se centrifugó a 12,000 r.p.m. por 5 minutos, se retiró el sobrenadante y se adicionó 200 µl de SDS 0.1% a la pastilla, se disolvió y se dializó por 24 horas contra SDS 0.1% y posteriormente otras 24 horas contra SDS 1%. La concentración de proteína fue determinada con el método de microlowry.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## B.- CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL MICROMETODO DE LOWRY.

**1.- Preparación de la curva estándar.-** Se preparó una solución stock de proteína con albúmina de huevo ( 1mg/ml ).

**Tabla 2.** Curva de calibración para la determinación de proteínas por el método de micro lowry

TUBO	STOCK <sup>+</sup> ( $\mu$ l)	AGUA ( $\mu$ l)	CONCENTRACION (mg/ml)
1	0.0	200.0	0.000
2	12.5	187.5	0.025
3	25.0	175.0	0.125
4	50.0	150.0	0.250
5	75.0	125.0	0.375
6	100.0	100.0	0.500

<sup>+</sup>albúmina bovina

**2.- Preparación de la muestra.-** Se realizaron diluciones seriadas de 10  $\mu$ l de la suspensión de proteínas. En una placa de 96 pozos se colocaron 100



$\mu$ l/pozo de las diluciones de proteínas totales de las células FLK-BLV ( todas las muestras se colocaron por duplicado ). Se agregaron 25  $\mu$ l de solución de tartrato de cobre 5X ( soluciones A, B, C en relación 1:1:100 ), la placa se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Se agregaron 10  $\mu$ l de la solución de Folin, posteriormente se incubó por 20 minutos a temperatura ambiente y finalmente se realizó la lectura a 630 nm.

### VIII.-ENSAYO IMUNOLOGICO LIGADO A ENZIMA (ELISA)

Método descrito por Cowley et al en 1992 ( 9 ) para la detección de antígenos expresados en cultivo de las células FLK-BLV.

Las células FLK-BLV fueron removidas de la placa con un gendarme y las proteínas fueron obtenidas con el método de TRIZOL, se ajustó a 5  $\mu$ g en 90  $\mu$ l de agua bidestilada y 10  $\mu$ l de solución de cubierta, ésta solución se adicionó a una placa de ELISA que se dejó incubar toda la noche a 4°C, los pozos se lavaron con 200  $\mu$ l de una solución de 0.1% de tween 20 en PBS 1X y se le adicionó 100  $\mu$ l de suero bovino positivo al BLV en una dilución de 1:30 en 5% de leche descremada, se incubó durante 2 h a 37°C, la placa se lavó 3 veces cada una por 5 minutos y posteriormente se le agregó 100  $\mu$ l de conjugado anti-bovino en una dilución de 1:5000 con la leche descremada y se dejó incubar durante 1 h, se lavaron nuevamente 3 veces por 5 minutos, y se le adiciono 100  $\mu$ l del sustrato para la peroxidasa (10 mg de OPD en solución de citrato pH5 y 30  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), se dejó incubar 30 minutos, pasado este tiempo la placa fue leída a 414-492 nm.

## IX.- INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

### a).- Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.

Se desnaturalizó la proteína total en solución de muestra a ebullición por 2 minutos, se colocaron 80 µg de proteína por pozo en un gel de acrilamida al 12%, se usó para el corrimiento una solución balanceada de glicina, la muestra se corrió a 100 V (volts ) constantes durante 5 horas.

### b).- Transferencia en membrana de nitrocelulosa e Inmunodetección.

Se utilizó un bastidor y sus componentes para transferir las proteínas, se formó un “sandwich” cuyo orden de los componentes en dirección de polo positivo a negativo fue el siguiente: un panel de fibra, papel filtro, el gel de poliacrilamida, la membrana de nitrocelulosa ( MN ), papel filtro y el otro panel de fibra, posteriormente el bastidor se colocó en una cámara de transferencia (BIO-RAD) con solución balanceada de glicina-metanol, el tiempo de corrimiento fue de 12 h. a 200 mA constantes. Posteriormente la membrana de nitrocelulosa fue teñida con colorante rojo ponceau durante 5 minutos para visualizar las bandas de proteínas y se lavó con agua bidestilada para eliminar el colorante. Posteriormente la MN fue bloqueada con 10 ml de solución de TBS-TWEEN 2.5% durante 10 minutos, se retiró la solución y se agregó el suero problema diluido 1:100. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 horas. Se lavó la MN por 10 minutos, 2 veces con TBS-tween 0.05% y una vez con TBS, posteriormente se incubó por una hr con 5 ml de conjugado IgG antibovino marcado con peroxidasa en una dilución de 1: 5000 en TBS, Se lavó la MN por 10 minutos, 2 veces con TBS-tween 0.05% y una vez con TBS, se añadió como sustrato diaminobenzidina

0.05%, posteriormente se agregó 80 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por cada 40 ml de solución de sustrato, se agitó hasta que se observaran las bandas en un tiempo aproximado de 10 minutos, se adicionó ácido clorhídrico para detener la reacción, finalmente se lavó dos veces con agua bidestilada

## **X CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD DE LA TRANSCRIPTASA REVERSA**

### **A) AISLAMIENTO VIRAL**

#### **AISLAMIENTO DE PARTICULAS VIRALES POR PRECIPITACION CON PEG.**

El medio de cultivo de las células FLK-BLV cultivadas por 72 h se centrifugó a 2000 g por 30 minutos, se transfirió el sobrenadante a otro tubo y se le adicionó 1 ml de PEG (PEG 8000, 30 % (v/v); NaCl 0.4mol/l ) por cada 2 ml de sobrenadante se mezcló perfectamente, se incubó toda la noche en hielo y se centrifugó a 800 g por 35 minutos, se descartó el sobrenadante ( cuidadosamente las últimas gotas de PEG ) y se almacenó a -70 ° C hasta su uso.

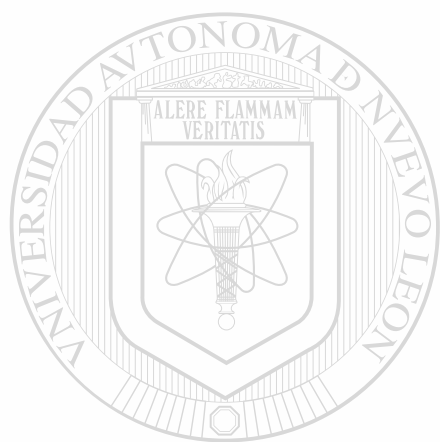
**Tabla 3. Curva de calibración de la R-T**

<b>HIV-1-R-T concentración (ng/pozo)</b>	<b>HIV-1R-T dilución de trabajo (0.2ng/μl)</b>	<b>BUFFER DE LISIS solución V</b>
0	0 μl	40 μl
0.2	1 μl	39 μl
0.5	2.5 μl	37.5 μl
1	5 μl	35 μl
2	10 μl	30 μl
4	20 μl	20 μl
6	30 μl	10 μl
7	35 μl	5 μl

## **B) ENSAYO DE TRANSCRIPTASA REVERSA**

Esta prueba se realizó siguiendo las especificaciones del Kit Ensayo de la Transcriptasa Reversa no cuantitativo de Boehringer Mannheim. Para lisar los virus se resuspendió la pastilla en 40 μl de solución de lisis y se incubó a temperatura ambiente 30 minutos. Se le adicionó 20 μl de solución de reacción y se incubó por 15 h a 37°C. Se transfirió la muestra (60μl) a los pozos, se cubrieron con una cinta adherente y se incubaron 1 h a 37°C, se descartó la solución y se golpeó suavemente la tira de pozos en un paño seco libre de pelusa, se lavó cada pozo 5 veces con 250 μl de solución de lavado 1X por un mínimo de 30 segundos por lavado. Se adicionó 200 μl de la dilución de trabajo 200 mU/ml anti DIG-POD por pozo, se incubaron 1 h a

37°C, se descartó la solución y se lavó nuevamente con 250 µl de solución de lavado 1X, se le adicionó 200 µl de sustrato POD y se incubó a temperatura ambiente hasta que el control positivo presentó un color verde que pudo ser claramente distinguido del color púrpura del sustrato del control negativo, se midió la absorbancia a 405 nm con una onda de referencia a 490 nm en un lector de ELISA.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

# RESULTADOS

## I.- OPTIMIZACION DE CONDICIONES DE TRANSFECCION CON LIPOSOMAS

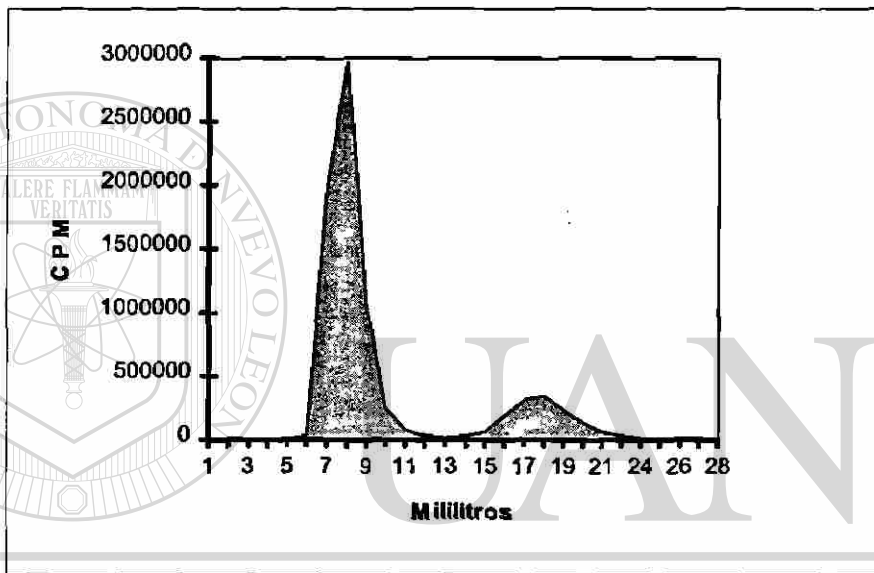
Para aumentar el nivel de transfección y especificidad hacia las células blanco se sintetizaron inmunoliposomas (Liposomas cubiertos con anticuerpos dirigidos contra la Gp51 una proteína de la membrana viral del BLV,). Los anticuerpos fueron pegados a los liposomas con la finalidad de dirigirlos hacia las células blanco, estos anticuerpos se produjeron en fluido ascítico de ratones Balb/c y fueron concentrados con sulfato de amonio y purificado con una columna de afinidad de proteína A sepharosa donde se obtuvo 10 mg de anticuerpos por ml, estos fueron marcados con iodo radioactivo y con isotiocianato de fluoresceína.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

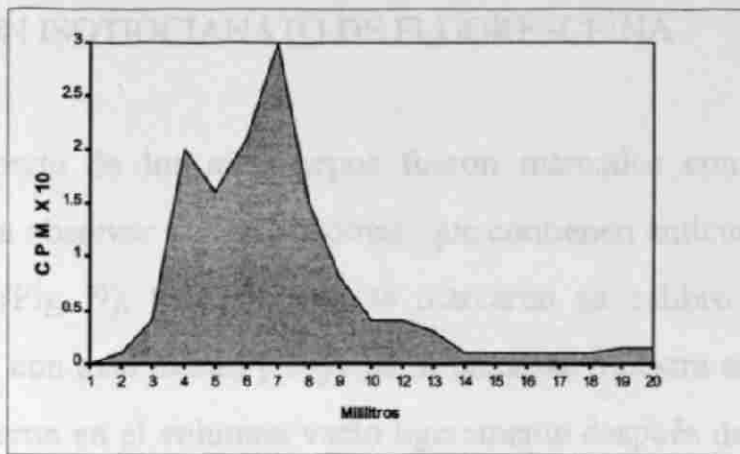
### A) MARCAJE CON I<sup>131</sup>

Se marcaron parte de los anticuerpos con 50  $\mu$ Ci de iodo radioactivo y para eliminar el exceso de marca los anticuerpos se pasaron através de una columna de sefadex G50 obteniéndose un pico máximo de  $3 \times 10^6$  cuentas por minuto (Fig.4). Los anticuerpos fueron unidos a los liposomas con glutaraldehído y para eliminar los anticuerpos que no se unieron a los liposomas se pasaron através de una columna de sefarosa 4B, se observaron 2 picos, uno que corresponde a los liposomas en la alícuota número 4 y el otro corresponde a los anticuerpos que no

se unieron a los liposomas como se muestra en la figura 5, en un gel de retardamiento sin condiciones desnaturalizantes se puede ver como los liposomas migran en la parte superior del gel por su alto peso molecular comparado con la banda de los anticuerpos que migran más abajo (Fig. 6).



**Figura 4.** Purificación de los anticuerpos marcados con  $I^{131}$ . La purificación de los anticuerpos se realizó en una columna de sephadex G50.



**Figura 5.** Purificación de los inmunolisosomas marcados con  $I^{131}$  en una columna de sefarosa 4B



← Inmunolisosomas

← Anticuerpos

**Figura 6.** Migración electroforética de los inmunolisosomas marcados con  $I^{131}$  en un gel de poliacrilamida sin condiciones desnaturizantes.

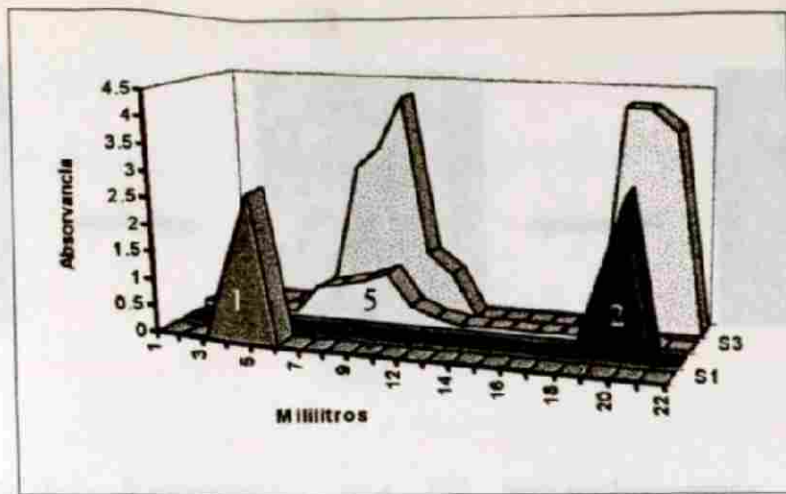


## B) MARCA CON ISOTIOCIANATO DE FLUORESCÉINA

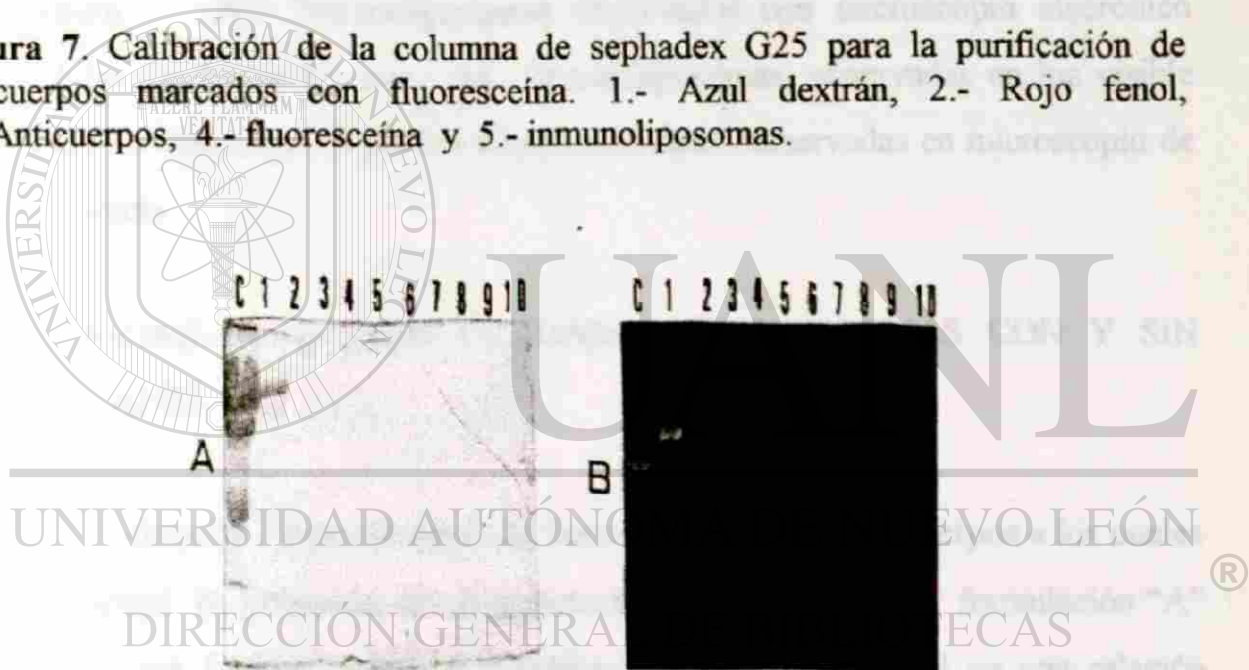
La otra parte de los anticuerpos fueron marcados con isotiocianato de fluoresceína para observar si los liposomas que contienen anticuerpos llegan a las células blanco (Fig. 9), una vez que se marcaron se calibró una columna de sephadex G25 con azul extrán y rojo fenol como se muestra en la figura 7, los anticuerpos cayeron en el volumen vacío ligeramente después del azul extrán y la fluoresceína que no se pegó a los anticuerpos como tiene un peso molecular de 389.4 muy semejante al rojo fenol (376) cae en las mismas alicotas. Para verificar la pureza de los anticuerpos se corrió en un gel de acrilamida al 12 %, y para observar si las diferentes alicotas con anticuerpo estaban marcados con fluoresceína el gel se llevó a un transiluminador de luz UV donde podemos ver la marca de la fluoresceína como se observa en la figura 8, estos anticuerpos se pegaron a los liposomas por el procedimiento de glutaraldehído y se pusieron en contacto con las células FLK-BLV, en la figura 11 se observan las células tratadas con inmunoliposomas.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

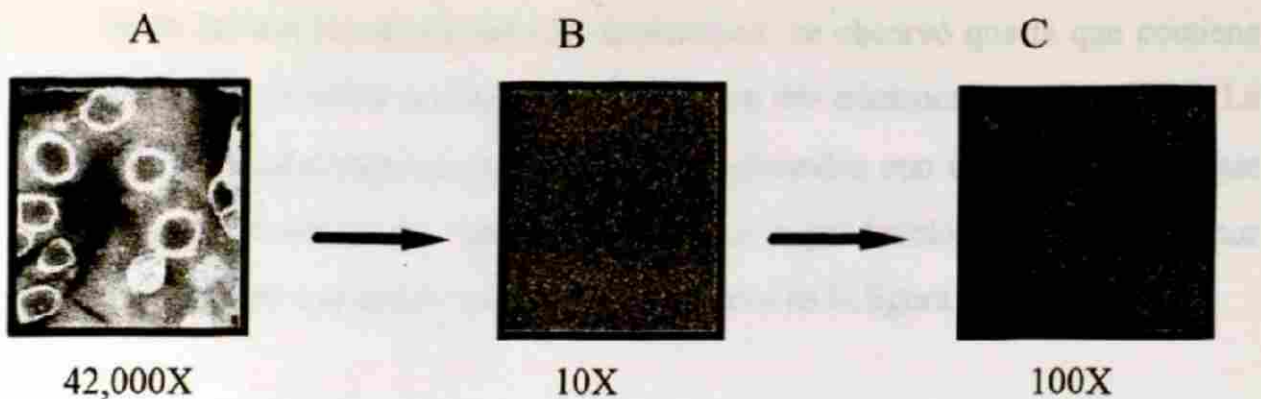
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**Figura 7.** Calibración de la columna de sephadex G25 para la purificación de anticuerpos marcados con fluoresceína. 1.- Azul dextrán, 2.- Rojo fenol, 3.- Anticuerpos, 4.- fluoresceína y 5.- inmunoliposomas.



**Figura 8.** Corrimiento electroforetico de las IgG marcadas con fluoresceína. A) Gel de acrilamida teñidas con azul de coomassie B) Gel de acrilamida visto en un transiluminador de UV.



**Figura 9.** Células fluorescentes por los inmunoliposomas marcados con fluoresceína. A).- Inmunoliposomas observados con microscopio electrónico B).- Células incubadas 1h. con los inmunoliposomas, observadas en luz visible C ).- Células fluorescentes por los inmunoliposomas observadas en microscopio de luz ultravioleta.

## II ACTIVIDAD DE $\beta$ -GALACTOSIDASA EN LIPOSOMAS CON Y SIN ANTICUERPOS

Se realizaron 2 formulaciones de liposomas con y sin anticuerpos a los cuales se les agregó el plásmido de  $\beta$ -galactosidasa (Fig. 10), la formulación "A" constituida con fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y colesterol en una relación molar de 6:2:2. En los liposomas A sin anticuerpo se obtuvieron 2 unidades de  $\beta$ -galactosidasa, mientras que en la misma formulación con anticuerpo se obtuvo 12 unidades, lo cual nos dió una eficiencia 5 veces mayor que la que no tiene anticuerpo, con la formulación "B" la cual esta constituida con fosfatidilcolina, ácido fosfátidico y colesterol en una relación molar 5 :4 :1, se obtuvieron 4 unidades de  $\beta$ -galactosidasa sin anticuerpos y con anticuerpo, se obtuvieron 22 unidades lo cual corresponde a un incremento de eficiencia 4.5 mayor.

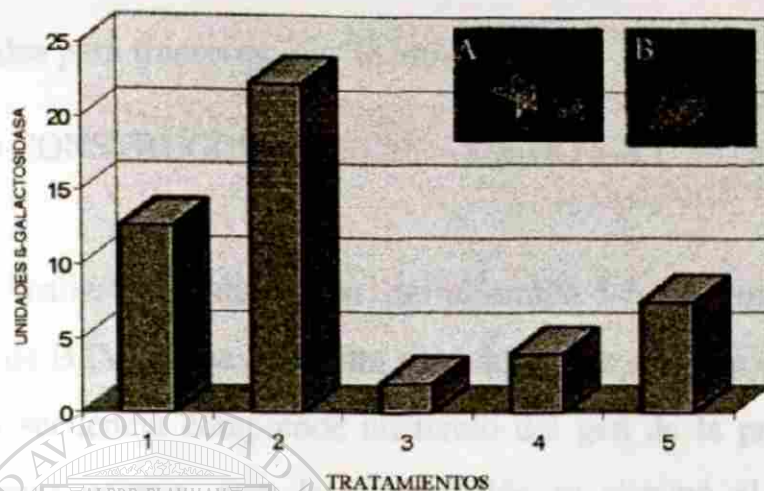
Entre las dos formulaciones con anticuerpos se observó que la que contiene ácido fosfatídico es mejor acarreador de DNA (con una eficiencia casi del doble). La actividad de  $\beta$ -galactosidasa en las células transfectadas con calcio fue mejor que con las formulaciones sin anticuerpos, sin embargo su producción fue mucho menor que los liposomas con anticuerpos como se observa en la figura 11.



**Figura 10.** Mapa del plásmido pSv- $\beta$ -galactosidasa



### III. CONSTRUCCION DE PLASMIDOS PARA LA SINTESIS DE ANTICUERPOS



**Figura. 11.** Actividad de  $\beta$ -galactosidasa en los extractos de células FLK-BLV. 1) Fórmula A con anticuerpos 2) Fórmula B con anticuerpos 3) Fórmula A sin anticuerpos, 4) Fórmula B sin anticuerpos. 5) Transfección con fosfato de calcio.

A) Células FLK-BLV con inmunoliposoma "A" fluorescente.

B) Células FLK-BLV con inmunoliposoma "B" fluorescente.

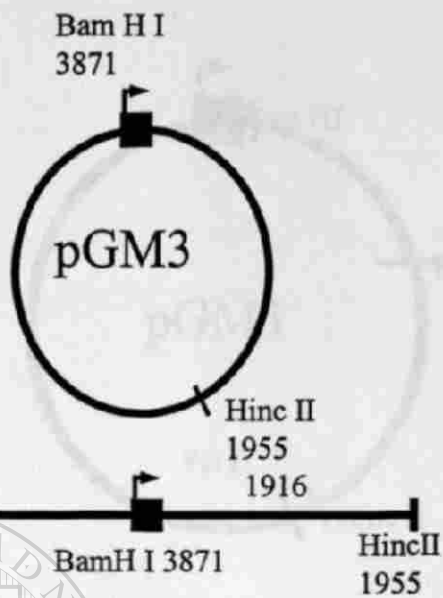
### III.- CONSTRUCCION DE PLASMIDOS PARA LA SINTESIS DE ANTISENTIDOS

plásmidos para transcripción "in vitro"

#### A) CONSTRUCCION DEL PLASMIDO 5-6.1

Se realizó la modificación del plásmido 5-6 que contiene una secuencia de 1916 pb de BLV que se encuentra entre los sitios de corte HincII y Bam HI (Fig. 12), esta secuencia comprende un tercio del gen de la proteasa y el gen de la transcriptasa reversa, para la construcción se eliminó el tercio del gen de la proteasa digiriendo el plásmido con PstI el cual corta en el sitio de clonación múltiple (SCM) y en un sitio interno del fragmento viral liberando un fragmento de 1425 pb como se observa en las figuras 13 y 14A, dando origen al plásmido p5-6.1 (fig.14B) después de la ligación el cual se modificó el sitio de inserción del fragmento viral siendo ahora BamHI-PstI en lugar del sitio HincII-BamHI que presentaba anteriormente, esta región quedó constituida de 491 pb, en la figura 15 se observa la diferencia en tamaño entre el plásmido 5-6 y 5-6.1 .

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



5-6

HincII-BamHI  
1/3 prot + RT  
lineariza con HindII

Figura 12. Mapa del Plásmido original 5-6.

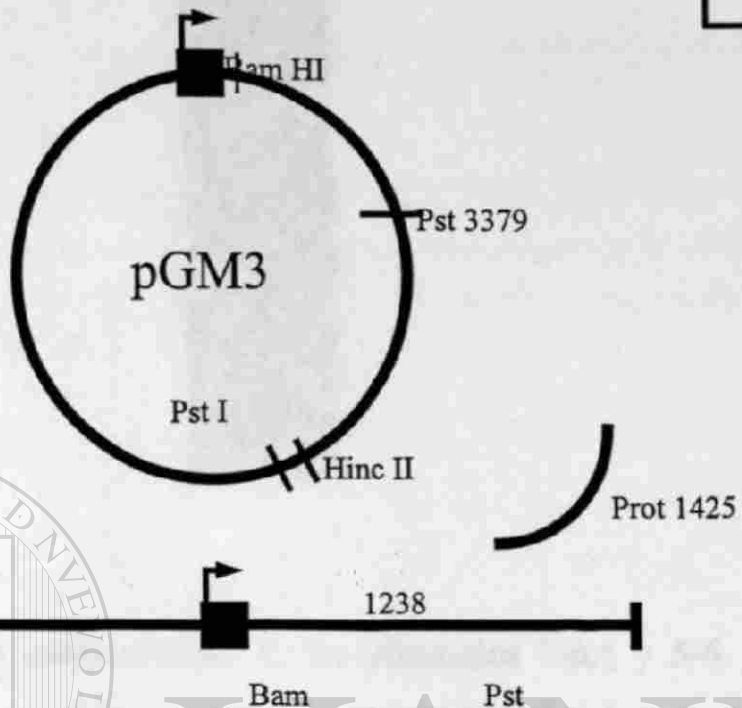
1 2 3



Figura 13. Liberación del fragmento PstI del plásmido 5-6. Gel de agarosa al 0.8% que muestra los patrones electroforéticos del plásmido 5-6. Carril 1.- digerido con BamHI-PstI, carril 2.- PstI

A

5-6



B

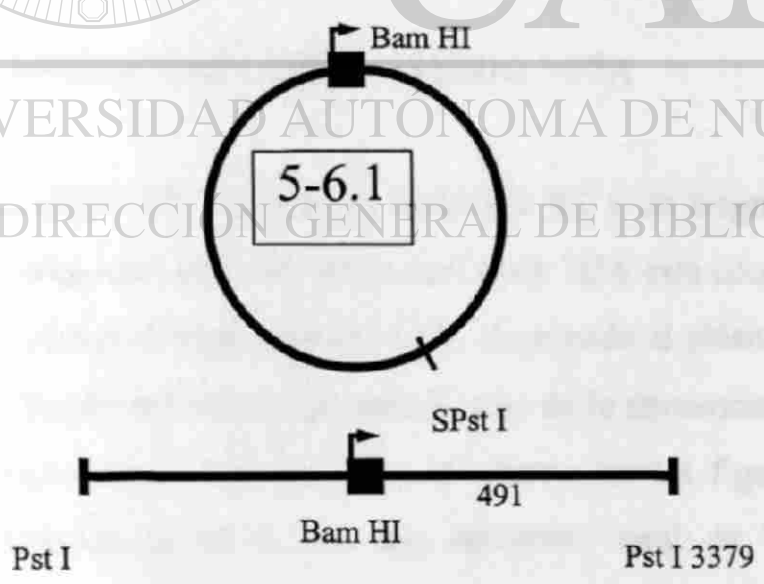
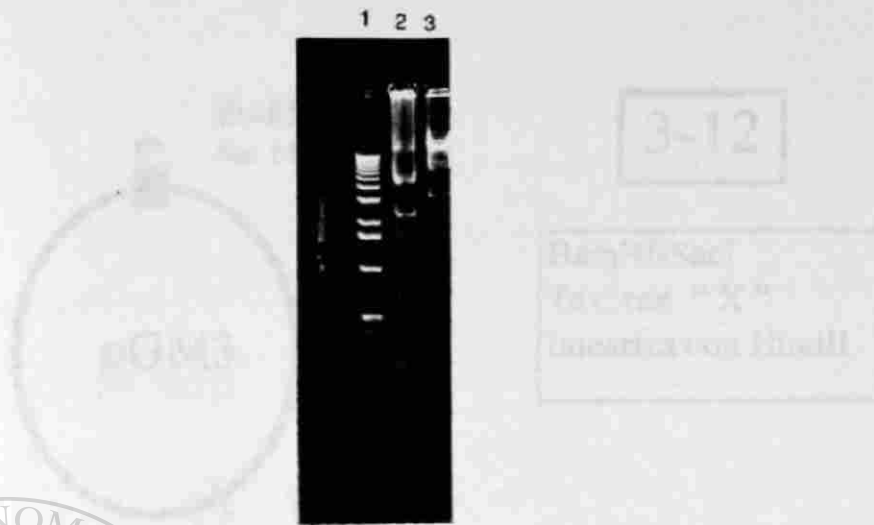


Figura 14 Construcción de plásmido 5-6.1

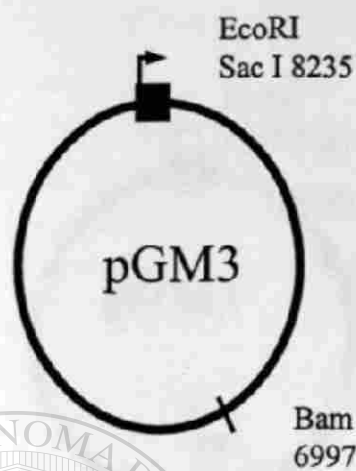




**Figura 15.** Patrón electroforético de los plásmidos 5-6.1 y 5-6. Gel de agarosa teñido con bromuro de etidio, carril 1.- Marcador de peso molecular (1Kb DNA lader) carril 2.- p5-6.1 y carril 3.- p5-6.

#### B) CONSTRUCCION DEL PLASMIDO 3-12A

El plásmido 3-12 contiene la secuencia pX y un fragmento del LTR, ésta secuencia se encuentra entre los sitios SacI-Bam HI y esta constituida de 1238 pb (Fig.16), se eliminó el fragmento del LTR digiriendo el plásmido con Eco RI que corta el sitio EcoRI del SCM y un sitio interno de la secuencia LTR con lo cual se liberó un fragmento de 516 pb como se observa en las figuras 13, y 17 dando origen al plásmido p3-12 A con una secuencia viral de 722 pares de bases (fig.18B).



3-12

BamHI-SacI  
Tax, rex "X"  
lineariza con HindII

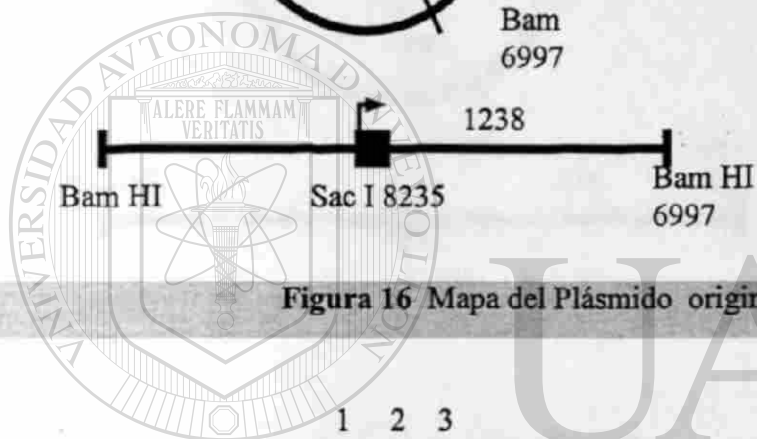


Figura 16 Mapa del Plásmido original 3-12

1 2 3



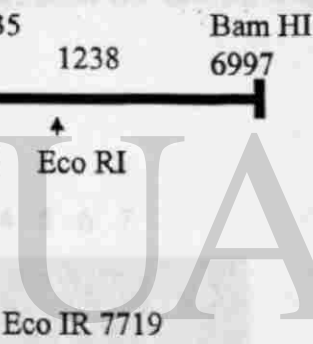
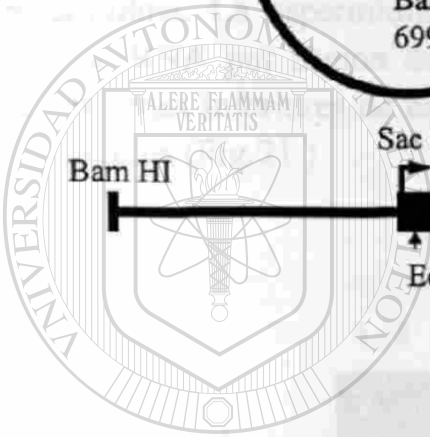
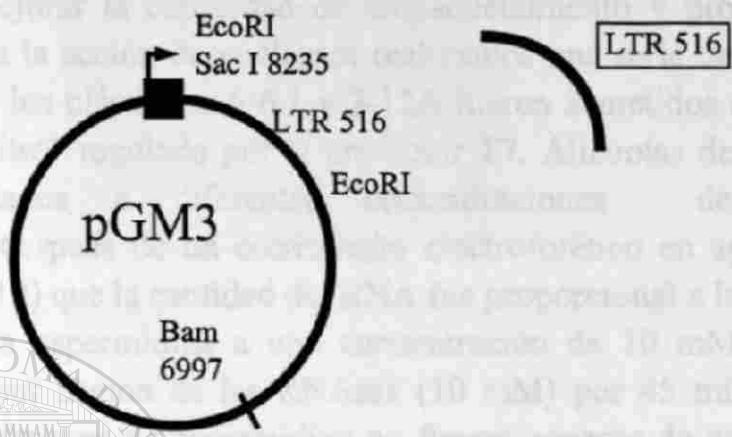
Fragmento XbaI/EcoRI

Fragmento EcoRI-EcoRI

**Figura 17.** Liberación del fragmento EcoRI del plásmido 3-12. Gel de agarosa al 0.8% que muestra los patrones electroforéticos del plásmido 3-12, carril 1.- plásmido no digerido, carril 2.- digerido con EcoRI, carril 3.- digerido con EcoRI y XbaI.

A

3-12



B

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

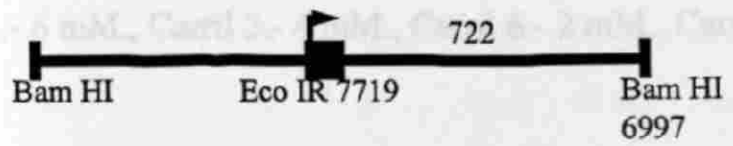
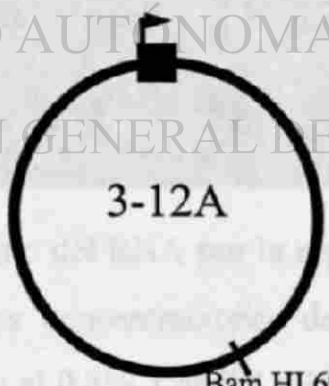
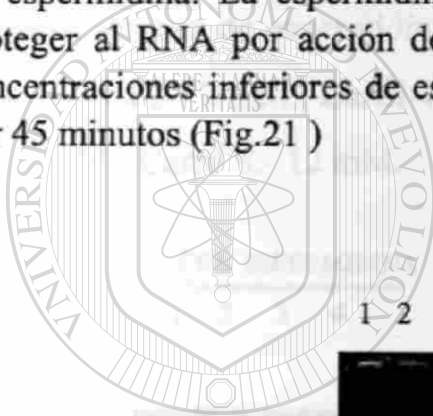


Figura 18. Construcción del plásmido 3-12 A

#### IV.- EMPAQUETAMIENTO DEL RNA CON ESPERMIDINA Y ENSAYOS DE PROTECCIÓN

Buscando mejorar la capacidad de empaquetamiento y protección de los RNA antisentidos a la acción de nucleasas realizamos una serie de ensayos con la espermidina donde los plásmidos 5-6.1 y 3-12A fueron sometidos a un ensayo de transcripción "in vitro" regulado por el promotor T7. Alícuotas de 5  $\mu$ g de RNA fueron empaquetados a diferentes concentraciones de espermidina (de 1 a 10 mM) después de un corrimiento electroforético en agarosa al 0.8% observamos (Fig. 19) que la cantidad del RNA fue proporcional a la concentración de espermidina. La espermidina a una concentración de 10 mM fue capaz de proteger al RNA por acción de las RNAsas (10 mM) por 45 minutos (Fig.20), concentraciones inferiores de espermidina no fueron capaces de proteger al RNA por 45 minutos (Fig.21)



1 2 3 4 5 6 7



UNIVERSIDAD

DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN

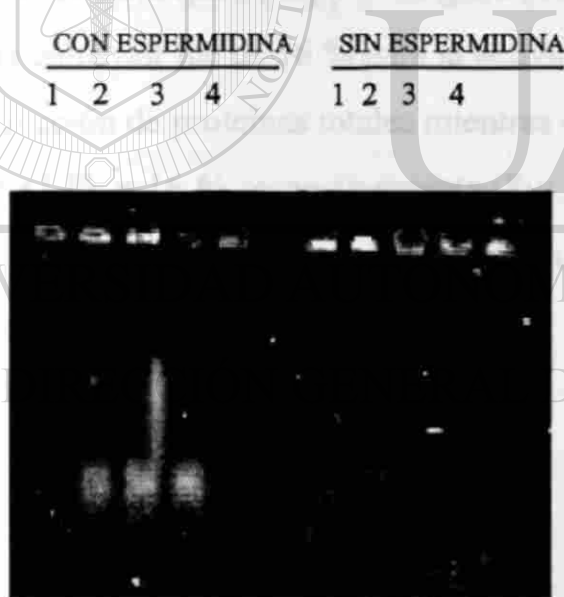
BIBLIOTECAS

®

**Figura 19.** Empaquetamiento del RNA por la espermidina. 5  $\mu$ g de RNA fueron empaquetados con diferentes concentraciones de espermidina, centrifugados y corridos en un gel de agarosa al 0.8%. Carril 1.- 12 mM., Carril 2.- 10 mM., Carril 3.- 8 mM., Carril 4.- 6 mM., Carril 5.- 4 mM., Carril 6.- 2 mM., Carril 7.- 1mM.



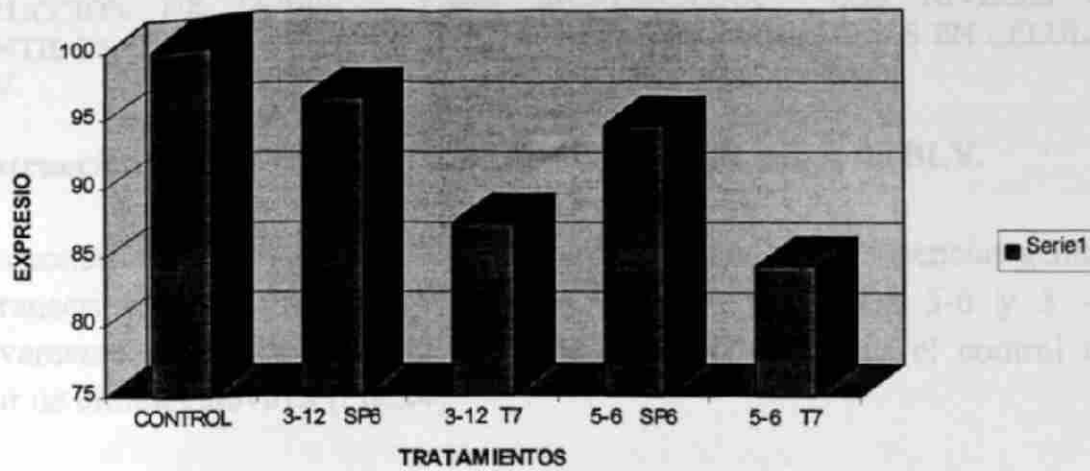
**Figura 20.** Ensayo de protección del RNA a la acción de las RNAasa a diferentes concentraciones de espermidina por 45 minutos. Carril 1.- 0 mM., Carril 2.- 0.5 mM., Carril 3.- 2 mM., Carril 4.- 4 mM., Carril 5.- 6 mM., Carril 6.- 8 mM., Carril 7.- 10mM., Carril 8.- 12 mM.



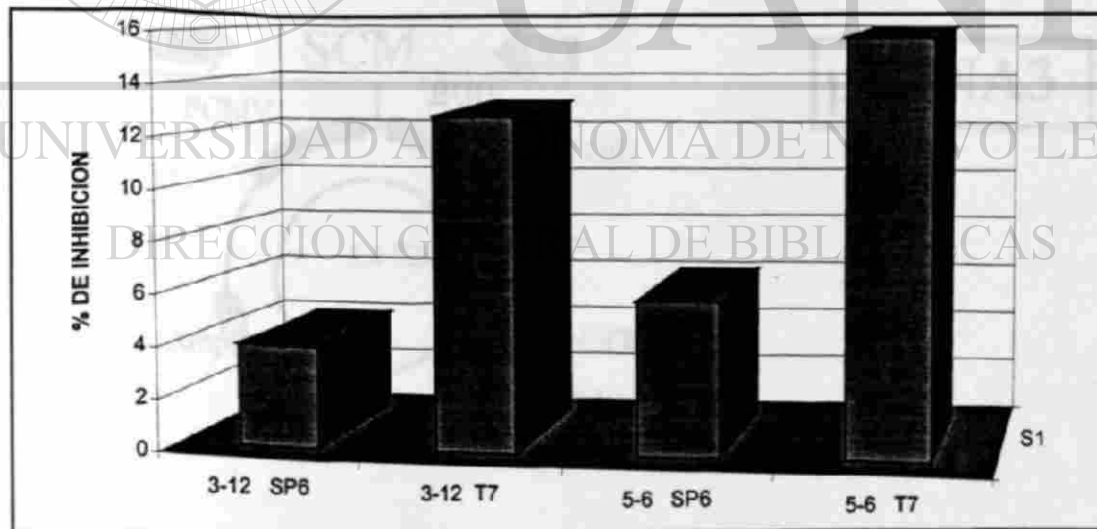
**Figura 21.** Protección del RNA con espermidina 10mM a la acción de RNAsa diferentes tiempos. Carril 1 ,15 min., carril 2, 30 min., carril 3, 45 min., carril 4, 60 mM.

## V.- INHIBICION DE LA ACTIVIDAD DE TRANSCRIPTASA REVERSA POR RNA ANTISENTIDOS Y SENTIDOS CONTRA POL Y PX

Las células FLK-BLV tratadas con RNAs sentido transcritos de los plásmidos 5-6.1 (pol) y 3-12A (pX) producidos bajo el control promotor SP6 empaquetados con espermidina y encapsulados en inmunoliposomas presentaron 94 y 96 % respectivamente de actividad a la transcriptasa reversa con respecto al control sin tratamiento mientras que con los tratamientos con RNA antisentidos se obtuvo una mayor inhibición de actividad de la transcriptasa , 84% con RNA antisentidos contra pol y 87% con RNA antisentidos contra pX como se muestra en la figura (Fig. 22). La diferencia entre los tratamientos con RNA sentido y antisentido es de 10% (para pol) y 9 % (para pX). El efecto de inhibición del RNA antisentido contra pol fue de 16 % para la actividad de transcriptasa reversa y 21% para la producción de proteínas totales mientras que con el RNA antisentido contra pX fue de 13 % y 16 % respectivamente.(Fig. 23). Se realizó la técnica de RT-PCR pero esta técnica no proporcionó ninguna información sobre los niveles de inhibición por los elementos antisentidos, por lo que decidimos no mostrar los datos.



**Figura 22.** Actividad de la transcriptasa reversa en células FLK-BLV tratadas con RNA sentido y antisentido. 3-12 SP6 RNA sentido para pX, 3-12 T7 RNA anti sentido para pX, 5-6 SP6 RNA sentido para pol, 5-6 T7 RNA anisentido para pol.



**Figura 23.** Inhibición de la expresión de la transcriptasa reversa y de proteínas vírales en células FLK-BLV tratadas con RNA sentido y antisentido.

## CONSTRUCCION DE PLASIDOS PARA INCREMENTAR LOS NIVELES DE ANTISENTIDOS CONTRA POL Y PX POR TRANSFERENCIA DE GENES EN CÉLULAS FLK-BLV.

### B) Construcción de plásmidos para la transferencia de genes de BLV.

La construcción de los plásmidos se realizó tomando las secuencias génicas de la transcriptasa reversa y la región Px de los plásmidos 5-6 y 3-12 respectivamente e insertándolos en el plásmido pcDNA3 bajo el control del promotor de citomegalovirus (Fig.24).

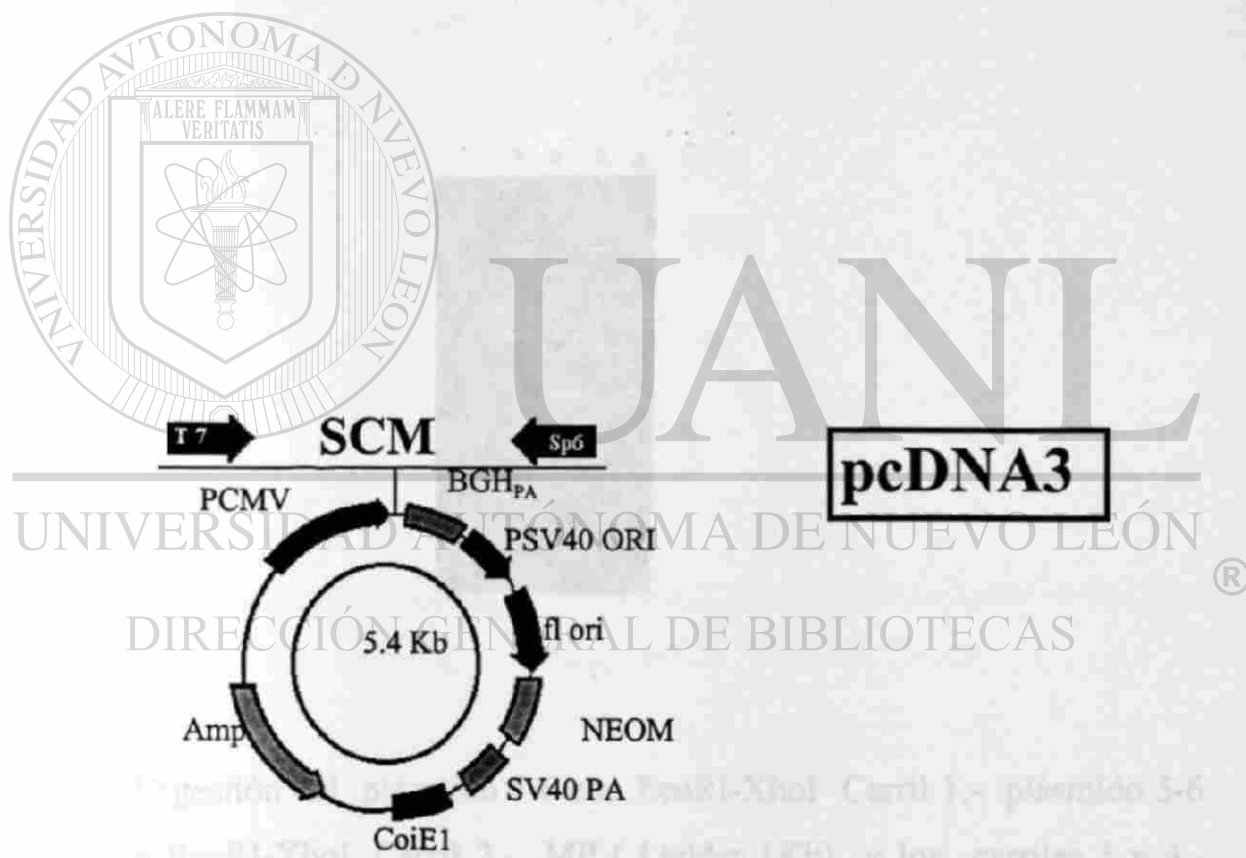
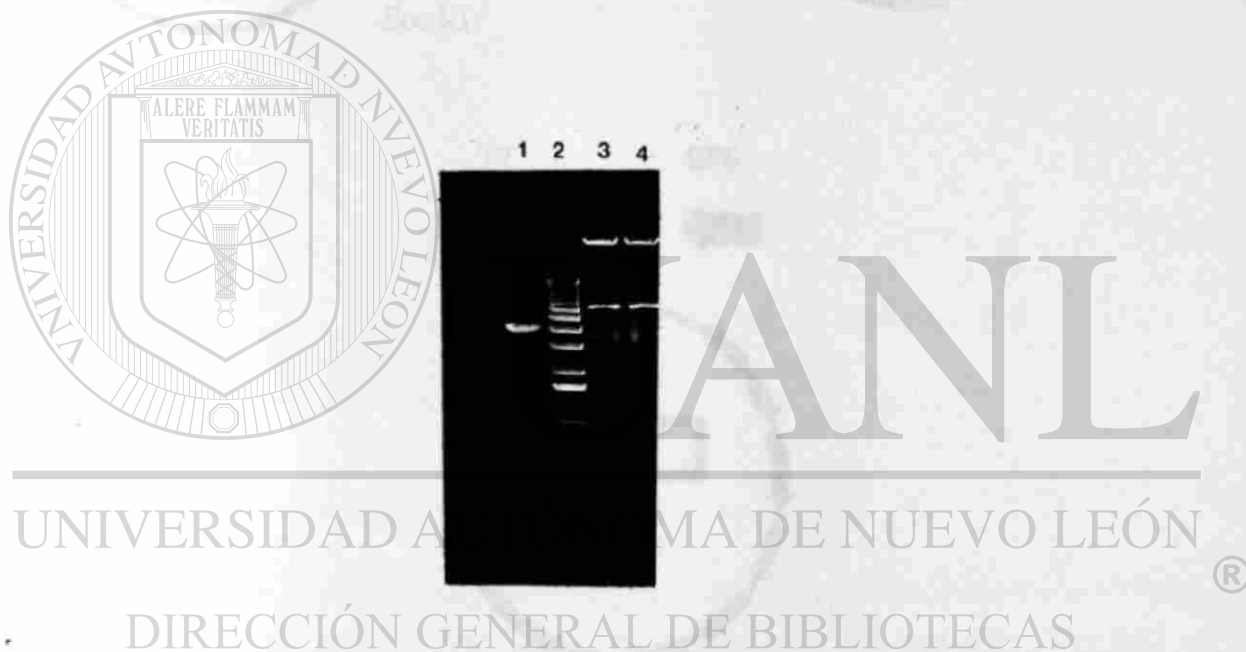


Figura 24. Mapa del plásmido pcDNA3



**Construcción del plásmido pVHP para la transferencia del gen pol .-** La secuencia del gen de la transcriptasa reversa en dirección antisentido del plásmido 5-6 se saco con las enzimas de restricción EcoRI-XhoI liberando un fragmento de aproximadamente 700 pb 21 pb de este fragmento son parte del sitio de clonación múltiple del pGM3 en la dirección de corte de EcoRI. (Fig.25) El fragmento de 700pb se introdujo en el sitio de clonación del plásmido pcDNA3 en dirección antisentido. La figura 26 esquematiza la construcción del plásmido pVHP



**Figura 25.** Digestión del plásmido 5-6 con EcoRI-XhoI Carril 1.- plásmido 5-6 digerido con EcoRI-XhoI, Carril 2.- MP ( Ladder 1Kb) y los carriles 3 y 4.- plásmido 5-6 digerido con EcoR.I

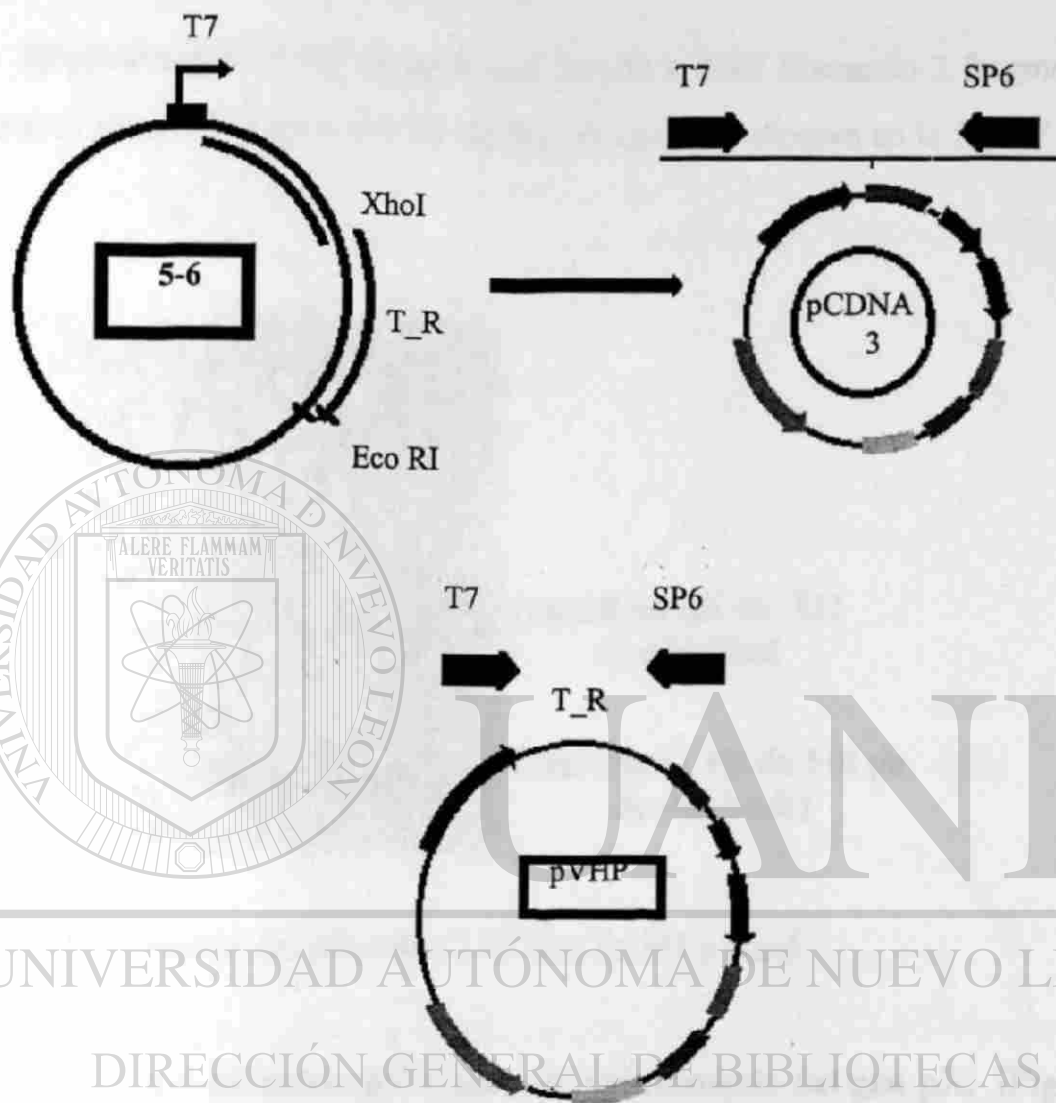


Figura 26 Diagrama de construcción del Plásmido pVHP

## VI.- CONSTRUCCION DE PLASMIDOS PARA LA TRANSFERENCIA DEL GEN pX Y LA SECUENCIA LTR DE BLV.

El plásmido 3-12 fue digerido con EcoRI y XbaI liberando 2 fragmentos, el fragmento pX de 722 pb y el LTR de 516 pb como se observa en la fig. 27.



**Figura 27.** Digestión del plásmido 3-12 con EcoRI y XbaI

**Construcción del plásmido pVA para la transferencia del gen pX.** (Fig.28) la secuencia EcoRI-XbaI del gen pX se insertó en el sitio EcoRI-XbaI del sitio de clonación múltiple del plásmido pCDNA3 en dirección antisentido quedando controlada su transcripción bajo el promotor de citomegalovirus.

**Construcción de plásmido ALTR para la transferencia de la secuencia LTR** (Fig.28) se construyó tomando la secuencia EcoRI-EcoRI del LTR e introduciéndola en pCDNA3 (Fig.27). El patrón electroforético de los plásmidos se observa en la figura ( 29 ).

CONSTRUCCION DE pVA y pALTR

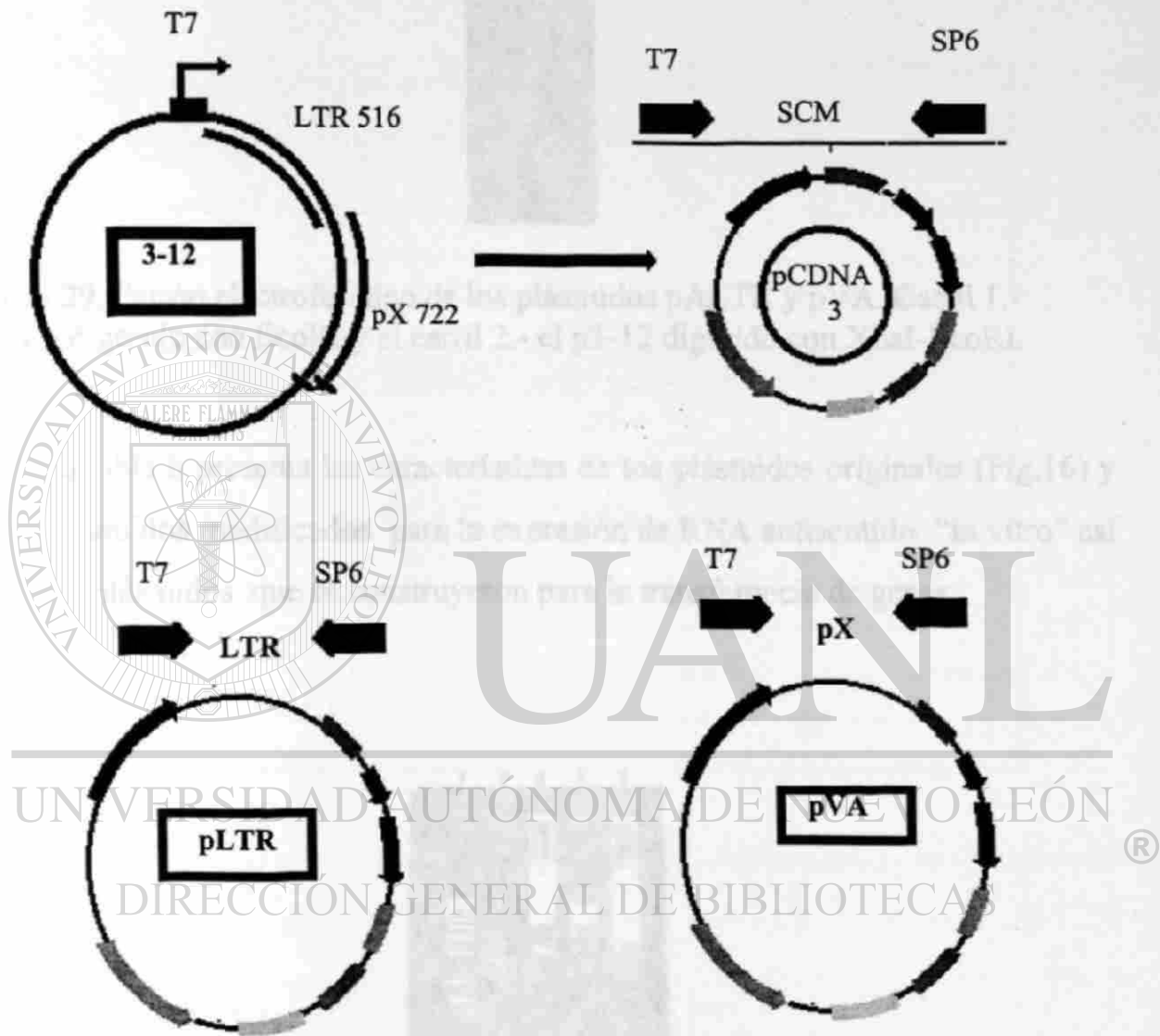


Figura 28. Diagrama de construcción de los Plásmidos pALTR y pVA

1 2



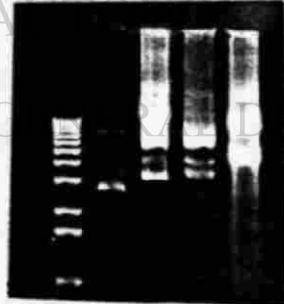
**Figura.29.** Patrón electroforético de los plásmidos pALTR y pVA. Carril 1.- pALTR digerido con EcoRI y el carril 2.- el p3-12 digerido con XbaI-EcoRI.

La tabla 6 presenta las características de los plásmidos originales (Fig.16) y de los plásmidos modificados para la expresión de RNA antisentido “in vitro” así como los plásmidos que se construyeron para la transferencia de genes.

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

1 2 3 4 5



**Figura 30.** Corrimiento electroforético de los plásmidos originales Carril 1.- MP ( Ladder 1Kb), carril 2.- p5-6, carril 3.- p3-12, Carril 4.- pCDNA3 y Carril 5.- p- $\beta$ -gal.

**Tabla 4. Características de los plásmidos originales y modificados**

No	plasmidos	características
<b>Plasmidos originales</b>		
1	p3-12	pX+LTR
2	p5-6	1/3 Prot + Pol
3	pCDNA3	
4	pSV- $\beta$ -gal	$\beta$ - galactosidasa
<b>plasmidos para expresión de RNA antisentidos "in vitro"</b>		
5	p3-12 A	pX
6	p5-6.1	Pol
<b>plasmidos para transferencia de genes</b>		
	p5-6 + pCDNA3	
7	pVHP	Pol
	3-12 +pCDNA3	
8	pALTR	LTR
9	pVA	pX

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## VIII.- INHIBICION DE LA EXPRESION DE BLV POR TRANSFERENCIA DE GENES ANTISENTIDOS

### A) TRANSFECCION DE LAS CELULAS FLK-BLV CON LOS PLASMIDOS pVA, pVHP, Y pALTR CON CLORURO DE CALCIO.

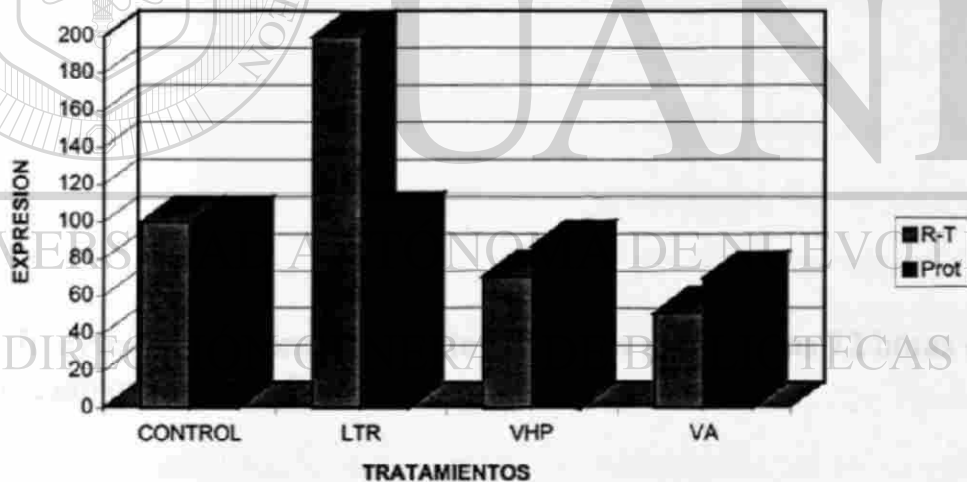
La expresión de BLV en las células FLK-BLV tratadas con los plásmidos VHP, VA y LTR fue medida por la actividad de transcriptasa reversa y por la expresión de proteínas virales. Los niveles de actividad de la transcriptasa reversa fueron medidos a las 72 h. Las células transfectadas con pVHP (pol) presentaron un 76% de actividad de la transcriptasa reversa con respecto al control sin transfección mientras que con pVA (pX) presentaron un 56.36 % de actividad, sin embargo en la transfección con pALTR se presentó un incremento en la expresión alcanzando un 276 % con respecto al control ( aumento de la actividad R-T de 176 %) . La inhibición de la expresión del virus fue más evidente cuando se midió la expresión de las proteínas virales (por medio de una prueba de ELISA cuantitativa) donde se encontró en la transfección con pVHP (pol) un 40% de expresión y con pVA (pX) únicamente un 4.2 % (inhibición del 95.8%) Los resultados de expresión de las proteínas virales de las células transfectadas con pALTR (LTR)® correlacionaron con los datos obtenidos de la actividad R-T, encontrando un 294% de expresión con respecto al control (aumento de expresión de 194%) (Figs.31,32 ).



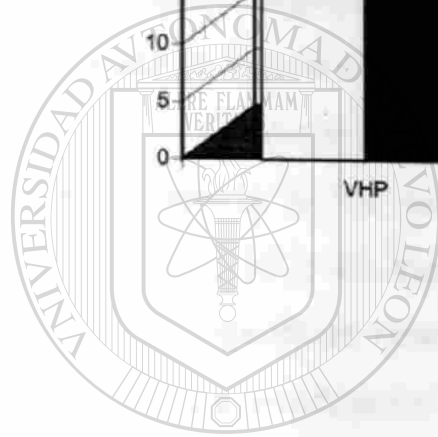
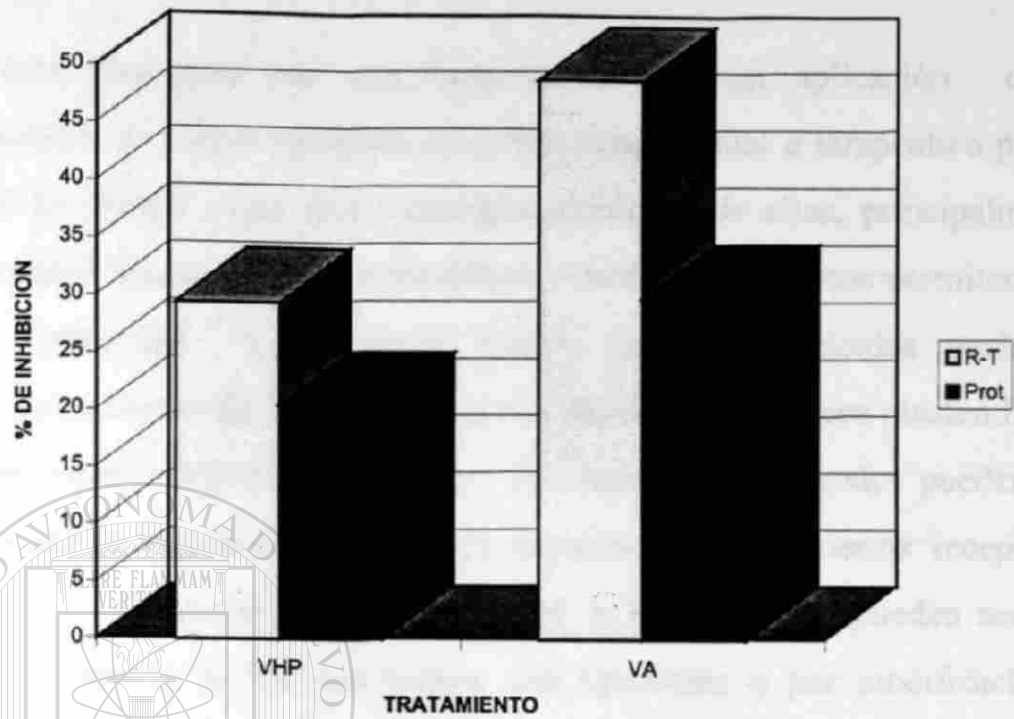


## B) TRANSFECCION DE LAS CÉLULAS FLK-BLV CON LOS PLASMIDOS pVA, pVHP Y pALTR ENCAPSULADOS EN INMUNOLIPOSOMAS.

La expresión de BLV en las células FLK-BLV tratadas con los plásmidos VHP, VA y LTR encapsulados en inmunoliposomas a las 72 horas post-transfección fueron los siguientes: con pVHP (pol) se detectó un 70.5% (29.5 % de inhibición) de actividad de la transcriptasa reversa y un 87% para las proteínas virales (13% de inhibición) mientras que con pVA se encontró un 51% de actividad R-T (49% de inhibición) y de expresión de proteínas virales un 70 % (30% de inhibición). Las células transfectadas con pALTR encapsulado con inmunoliposomas presentaron una expresión similar al control en la producción de proteínas virales 102% lo que indica un aumento de expresión 2%, mientras que en la actividad de R-T fue de 102%) (Fig.33,34 ).



**Figura 33** Actividad de la transcriptasa reversa y expresion de proteínas virales totales en las células FLK-BLV a las 72 horas después de la transfección con inmunoliposomas.



U A N L

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**Figura 34 . Inhibición de la producción de partículas virales a las 72 horas después de la transfección con inmunoliposomas.**

## DISCUSION

Los liposomas son una herramienta de gran aplicación como acarreadores de ácidos nucleicos en forma experimental o terapéutico por lo que se ha creado toda una tecnología alrededor de ellas, principalmente produciendo lípidos catiónicos sintéticos y modificaciones que permitan una mejor estabilidad y transportar mayor cantidad de ácidos nucleicos ( 38 ). Se ha observado que liposomas con ligandos específicos pueden llegar a unirse específicamente a cierto tipo de célula, estos ligandos pueden ser anticuerpos o proteínas que se unen específicamente a ciertos receptores celulares, el acoplamiento de los ligandos a los liposomas pueden ser por absorción directa de los anticuerpos con liposomas o por modificaciones químicas ( 77, 87 ). En éste trabajo sintetizamos liposomas cubiertos con anticuerpos específicos contra una proteína de membrana del virus de la leucosis bovina y utilizamos glutaraldeído para el acoplamiento de la IgG anti-Gp-51 a los liposomas, por ser una estrategia sencilla, económica y con acoplamiento del 70% de anticuerpos a la superficie de los liposomas ( 87 ). Nuestros inmunoliposomas fueron capaces de transfectar una mayor cantidad de células FLK-BLV con el plásmido pSR  $\beta$ -galactosidasa que los liposomas sin anticuerpo (5 veces más), por lo que lo consideramos un buen vehículo para transportar ácido nucleico hacia las células blanco. Otra característica fundamental de nuestros liposomas fue su formulación de lípidos, en un principio trabajamos con liposomas constituidos con fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina y colesterol en una relación molar de 6:2:2 (con esta formula se había reportado un acoplamiento del 70 % de anticuerpos sobre su

superficie) (87), sin embargo su eficiencia de transfección fue pobre por lo que decidimos utilizar los liposomas contruidos por fosfatidilcolina-acido fosfatidico y colesterol en una relación molar de 5:4:1 reportada por Ibañes y col. como su más eficiente formulación, con un coeficiente de encapsulamiento de 2.6 µg de DNA plasmídico por µMol de liposoma, este grupo de investigadores no realizaron acoplamiento de anticuerpos a los liposomas, nuestros inmunoliposomas con esta formula no presentaron la capacidad de transfección de la formulación de Ibañes y col. ya que en nuestro trabajo no adicionamos cloroquinas como inhibidores de nucleasas al momento de la transfección o EDTA como un incrementador de la permeabilidad celular, debido a que en este estudio deseábamos analizar la capacidad de esta formulación de inmunoliposomas para futuros estudios "in vivo". Diferentes grupos han establecido que las poliaminas son compuestos que empaquetan el DNA (16), lo protegen de la degradación de nucleasas (13,37), y permiten una mayor eficiencia de encapsulamiento del DNA condensado por liposomas, probablemente porque ocupa un menor volumen que el DNA sin condensar ya que la cantidad de lípidos retenidos como liposomas es mayor (37) por lo que decidimos empaquetar el DNA de los plásmidos con espermidina siguiendo el protocolo de Ibañes, sin embargo no hay reportes de la capacidad de las poliaminas para el empaquetamiento y la protección del RNA, en este trabajo encontramos que 10 µM de espermidina pueden empaquetar 5 µg de RNA y protegerlo hasta por 45 minutos de la degradación por RNAsas "in vitro". Algunos investigadores han tratado de conjuntar la síntesis de lípidos modificados con grupos de espermidina denominados lipoespermina que tienen una eficiencia de transformación de 2 a 3 veces más que las técnicas convencionales de CaCl<sub>2</sub>, (2).

La inhibición inespecífica de la expresión de los genes es una de las estrategias que se siguen por algunos tipos de drogas, sin embargo la inhibición de secuencias específicas de un gen es un concepto atractivo para el desarrollo de una nueva generación de terapéuticos entre los que se destacan los oligonucleótidos y RNA en dirección normal de transcripción para formar triples hélices con acción en cis para los promotores, o aquellos elementos antisentidos que bloquean la expresión de un RNA mensajeros, o bien los RNA enzimáticos también denominados “Ribozimas” que a diferencia de los RNA antisentidos estos cortan el mRNA y son ampliamente usados como una herramienta experimental o agente terapéutico (47).

En este trabajo analizamos el efecto de los RNA antisentidos contruados bajo la regulación del promotor T7 en los cuales los resultados obtenidos fueron bastante bajos con una inhibición de 13% para los antisentidos contra pX y 16% para los antisentidos contra pol, sin embargo estas técnicas presentan resultados parciales para la supresión de un gen en particular y en algunos casos fracasan para la expresión del gen (1). Uno de los problemas en la inhibición de estos antisentidos pudo ser la degradación por nucleasas y el hecho de no tener una concentración constante para un bloqueo permanente durante el tiempo del experimento. Se han analizado oligonucleotidos antisentidos para la región pX en sistemas libres de células y se han obtenido un 59 y 49 % de inhibición cuando los antisentidos son dirigidos contra la región 5', un 12 % cuando son dirigidos contra la región media del fragmento pX y no se observó ningún efecto inhibitorio contra la porción 3' (11,12), en cultivo de células se ha observado una inhibición que va desde un 24 a un 84 %. ( 59 ).

En los RNA sentidos encontramos un pequeño efecto inhibitorio con respecto al control, este puede ser debido a la formación de la triple hélice con el DNA genómico inhibiendo la expresión viral, como ha sido sugerido por Laurosky et al. (47).

Se realizaron nuevas construcciones para producir RNA antisentido bajo el control del promotor de citomegalovirus debido a que los RNA antisentidos contruidos "in vitro" presentaron un bajo efecto de inhibición por las razones antes señaladas .

Los plásmidos para transfección de genes fueron contruidos bajo el promotor de citomegalovirus y transfectados en células FLK-BLV por 2 procedimientos diferentes con cloruro de calcio, y con inmunoliposomas.

Por el método de fosfato de calcio nuestras construcciones presentaron una inhibición de la actividad de la transcriptasa reversa de 24 % para pVHP (pol) y de 43.66 % para la construcción pVA (pX) y por inmunoliposomas fue de 29.5% y 49.1% respectivamente y por otra parte la inhibición las proteínas virales fue de 60% con pVHP y 96 % con pVA por el método de cloruro de calcio y 13 % a pVHP y 30 % pVA con inmunoliposoma. La eficiencia de los dos métodos fue equivalente por lo que el método de inmunoliposomas además de ser un método aplicable in vivo y específico en el reconocimiento de células infectadas con el virus es tan eficiente como el de fosfato de calcio, sin embargo la variación en los resultados con otros autores puede ser por la relación molar de plásmidos con respecto al numero de copias del virus de la leucosis bovina en la transfección, previos reportes sugieren que una efectiva inhibición de la replicación viral es llevada acabo con un exceso de RNA antisentidos en una relación de 100 a 1000 veces más que los mRNA blancos, ( 14) en BLV se ha observado que para tener una inhibición al 75 %

se requiere un exceso molar de 3:1 del plásmido que contiene el antisentido por DNA viral pregenómico (7) y en un exceso de 10:1 para tener una inhibición de 95 a 97 % (6), nuestros resultados para PVA (pX) entran dentro de las cifras reportadas, Murovska y col. encontraron una inhibición de un 28 a 83% en diferentes clonas de FLK-BLV con antisentidos contra pX, sin embargo en sus transfecciones realizaron un shock con glicerol para incrementar la eficiencia de transfección y seleccionaron clonas transfectantes con el genatisin o G418. En este trabajo considero que obtuvimos buenos niveles de transfección en un sistema con características que permitirán su aplicación 'in vivo' con bajos niveles de toxicidad, debido a que nuestras transfecciones se realizaron con inmunoliposomas sin potencializadores de la transfección.

Una de las estrategias comúnmente utilizadas para inhibir la expresión viral es el uso de nucleótidos análogos que interfieren con la funcionalidad de la transcriptasa reversa, en este trabajo nosotros logramos inhibir la actividad de la transcriptasa reversa hasta en un 49.1% con antisentido para pol , lo cual es resultado bastante atractivo si consideramos que esto es proporcional a la carga viral.

En este trabajo nosotros utilizamos la construcción pALTR que contiene la secuencia LTR en el sitio de clonación múltiple EcoRI-EcoRI lo cual dificulta determinar su orientación, sin embargo se ha observado que cualquiera que sea su orientación es capaz de producir una inhibición viral, ya que puede bloquear secuencias reguladoras como elemento antisentido o en dirección normal compitiendo con los promotores a los que se le une la p38 (proteína de regulación de la estabilidad de los mRNA ), se ha observado que



como antisentido produce una inhibición del 75% y como sentido presenta una inhibición del 60% en células CC81(79) y en clonas transfectadas de un 69 a 93% (59), sin embargo nosotros encontramos una sobre expresión de la actividad de transcriptasa reversa y de la producción de proteínas totales, nuestra secuencia LTR difiere de la reportada por Sayakhmetov y col. su secuencia esta constituida de 185 pb de la región U3 y la de nosotros de 400 pb que constituye 2 tercios de la región LTR .posiblemente esta región actúe como potencializador para la transactivación viral.(79).

Las células transfectadas fueron analizadas a las 72 horas por 2 razones principalmente . 1) el análisis de expresión o inhibición de la mayoría de los plásmidos se realiza preferentemente después de 48 horas pos transfección, 2) a las 48Hs la actividad de transcriptasa reversa fue muy baja (datos no mostrados) por lo que fueron analizadas a las 72 horas

En nuestra estrategia experimental la técnica de PCR no fue de mucha utilidad para la interpretación de los resultados de inhibición, posiblemente esto se debe a que la mayoría de los eventos de inhibición se realizaron a nivel de traducción y no de expresión de los mRNA virales (datos no mostrados), para la cuantificación por la técnica de PCR se requieren ciertos rangos de concentración de DNA posiblemente nos encontramos por arriba o por abajo de estos rangos, una estrategia sería medir concentración por espectrofotometría de cDNA antes de la amplificación y realizar las diluciones requeridas y seguir un método cuantitativo de PCR.



## **CONCLUSIONES**

En este trabajo se analizaron 4 construcciones para producir elementos antisentidos contra la regiones pol y pX bajo el control del promotor T7 y del citomegalovirus y 2 formulaciones para producir inmunoliposomas como acarreadores de acidos nucleicos a células FLK-BLV Los resultados obtenidos nos permiten concluir lo siguiente:

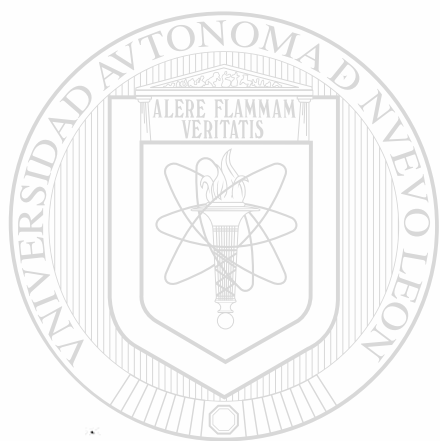
1. Se incrementó la capacidad de transfección de las células FLK-BLV ,con el acoplamiento a la superficie de los liposomas de anticuerpos anti-Gp51.
2. Los RNA antisentidos producidos “in vitro” bajo el promotor T7 producen un bajo efecto de inhibición de la expresión de BLV.
3. Sin embargo la transferencia de los plásmidos que producen RNA antisentidos bajo el control del promotor de citomegalovirus en las células produjeron un mayor efecto antiviral.
4. SE obtuvo una mayor inhibición de la actividad de la transcriptasa reversa y de la producción de proteínas vírales totales con elementos antisentidos dirigidos contra pX.
5. El plásmido pALTR (LTR) incrementa la actividad de la transcriptasa reversa hasta en un 200 %.

## PERSPECTIVAS

En este trabajo usamos el promotor de citomegalovirus para la producción de los elementos antisentidos, aunque este es un buen promotor se puede incrementar la producción de elementos antisentidos con promotores más fuertes como el de la timidina kinasa de herpes virus o bien usando promotores inducibles por los mecanismos de retroalimentación en las infecciones virales, como la secuencia LTR de BLV y HTLV que es inducida por la proteína *tax*, que si bien no interactúa directamente con el DNA, estimula una transactivación asociada con proteínas del hospedero sobre elementos de respuesta CRE/ATF, creemos que estas estrategias son buenas para la producción de antisentidos en células infectadas con retrovirus. Probablemente nuestra secuencia LTR que se encuentra en el plásmido pALTR que incrementa la expresión de la transcriptasa reversa sea un buen inductor de la expresión de los RNA antisentidos, por lo que es un buen candidato para controlar la expresión de las secuencias *pol* y *pX* que se encuentran en los plásmidos pVA y pVHP.

Nosotros pensamos que cambiando el protocolo de la formación de liposomas podemos obtener altos niveles de empaquetamiento de DNA y como consecuencia un mayor índice de transfección y de inhibición de la expresión viral. La utilización de los protocolos de acoplamiento de los anticuerpos a la superficie del liposoma por absorción directa y

sonificación pueden permitir una mejor interacción lípido-anticuerpo que con glutaraldehído con una menor manipulación de los liposomas y riesgos de contaminación.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LITERATURA CITADA

1. -Arndet, G.M. & G.H. Rank.1997. Colocalization of antisense RNAs and Ribozymes with target mRNAs. *Genome* 40(6) .785-797.
2. -Barthel F., J.S. Remy, J.P. Loeffler, & J P. Behr.1993. Gene transfer optimization with lipospermine-coated DNA. *DNA Cell Biol* 12:553-560.
3. - Boiziau, C., N.T. Thuong, & J.J. Toulme. 1992. Mechanisms of the inhibition of reverse transcription by antisense oligonucleotides. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* 89:768-772.
4. - Bordier, B., C. Helene, P. J. Barr, S. L. Litvak, & Sarin-Cottin. 1992. In vitro effect of antisense oligonucleotides on human immunodeficiency virus type I reverse transcription. *Nucleic. Acids. Res.* 20:5999-6006.
5. - Bryant.L.A, & J.H.Sinclair. 1993. Inhibition of human cytomegalovirus major immediate early gene expression by antisense RNA expression vectors. *J.Gen.Virol.* 74:1965-1967.
6. - Borisenko, A., D. M. Shaiakhmetov, A. G. Gerzilova , & T.I. Tikchonenko. 1994. Use of U3 promotor from the LTR region of bovine leukaemia virus for expressing genes for antiviral antisense RNA in cell culture *Mol. Gen. Mikrobiol. Virosol.* 3:16-20.

- 7.- Borisenko, A., O. Miroschnickhenko, & T.I. Tikchonenko. 1992. Inhibition of bovine leukaemia virus replication by the antisense RNA in cell line CC81. *Virus-Res.* 23:89-97.
8. - Burrige, M.J, 1981. Prevalence of bovine leukemia virus infection in Florida. *JAVMA.* 179:704-707.
9. - Chatterje, R., P.Gupta, S.V.S Kashmiri. & J.F. Ferrer 1985. Phytohemagglutinin activation of the transcription of the bovine leukemia virus genome requires of novo protein synthesis. *Journal of Virology.* 54:860-863.
- 10.- Cantin, E.M., G. Podsakoff, D.E. Willey, & H. Openshaw. 1992. Antiviral effects of herpes simplex virus specific anti-sense nucleic acids . *Adv. Exp. Med. Biol.* 312: 139-149.
- 11.-Cantor, G.H., & G.H. Palmer. 1992. Antisense oligonucleotide inhibition of bovine leukemia virus tax expression in a cell-free system. *Antisense-Res-Dev.* 2:147-152.
- 12.-Cantor, G.H., D. M. Stone, T. F. McElwain & G.H. Palmer. 1996. Comparison of the antiviral efficacy of ribozymes and antisense RNA against bovine leukemia virus rex /tax. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 6:301-304.

13.-Celano P., S. Baylin, & R. Casero. 1989. Polyamines differentially modulate the transcription of growth-associated genes in human colon carcinoma cells. *J. Biol.Chem.* **264**:8922-8927.

14.-Cotten M. & M.L.Birnstiel 1989. Ribozyme mediated destruction of RNA in vivo. *EMBO Jurnal* **8**:3861-3866.

15.- Cowlwy, J. A., J. B. Molloy, C. K. Dimmock, P. J. Walker, A. G. Bruyeres & W. H. Ward. 1992. Infectivity of bovine leukaemia virus infected cattle: An ELISA for detecting antigens expressed in in vitro cultured lymphocytes. *Vet. Microbiol.* **30**:137-150.

16.-Demeneix B. A., H. Abdel-Taweb, C. Benoist, I. Seugnet & J.P.Behr.1994. Temporal and spatial expression of lipospermine-compacted genes transferred into chick embryos in vivo. *Biotechniques* **16**. (3) 496-501.

17.- Derse, D., Caradona S. J. & Casey J. M. 1985. Bovine Leukemia Virus long terminal repeat: a cell type specific promoter. *Science.* **227**: 317-320.

18.- Derse, D., Diniak J. M., Casey J. M., & Deininger P.I. 1985. Nucleotide sequence and structure of integrated Bovine Leukemia Virus long terminal repeat. *Virology.* **141**:162-166.

19.- Derse, D. & Casey J. M. 1986. Two Elements in the Bovine Leukemia Virus long terminal repeat that regulate gene expression. *Science*. 231:1437-1440.

20.- Derse, D. 1987. Bovine Leukemia Virus transcription is controlled by a virus-encoded trans-acting factor and by cis-acting response elements. *J. of Virology*. 61:2462-2471.

21.- DeStefano, J.J. , R.A.Banbara., & P.J.Fay . 1993 . Parameters that influence the binding of human immunodeficiency virus reverse transcriptase to nucleic acid structures. *Biochemistry* 32(27) :6908-6915.

22.- Divita ,G., T.Restle., & R.S.Goody. 1993. Characterization of the dimerization process of HIV reverse transcriptase heterodimer using intrinsic protein fluorescence. *FEBS-lett* .324:153-158.

23.- Ezzell, C., 1987. AZT given the green light for clinical treatment of AIDS. 326.106.

24.-Ferrer, J. F., & Cabradilla C. 1981. Use of a Feline cell line in the syncytia infectivity assay for the detection of Bovine Leukemia Virus Infection in cattle. *Am. J. Vet. Res.* 42:9-13.

25.-Gabizon A., D.C. Price J. Huberty, R.S Bresalier & Papahadjopoulos.1990. Effect of liposome composition and other factors

on the targeting of liposome to experimental tumors: Biodistribution and imagin studies. *Cancer.res.*50:6371-6378.

26.- Ghysdael, J., Kettmann R., & Burney A. 1979. Translation of Bovine Leukemia Virus virion RNAs in heterologous Protein synthesizing systems. *J. of Virology.* 29: 1087-1098.

27.- Gooddarzi, G.M. Watabe., & K.Watabe. 1992. organ distribution and stability of phosphorothioated oligodeoxiribonucleotides in mice. *Biopharm-Drug-Dispos.* 13:221-227.

28.- Graves, C. D., A. D. Clement, & J. F. Ferrer. 1977. A Reverse Transcriptase Assay for Detection of the Bovine Leukemia Virus. *Am. J. Vet. Res.* 38:1739-1744.

---

29.- Grover, Y. P. & B. Guillemain. 1992. An Immunoblotting Procedure for Detection of Antibodies against Bovine Leukemia Virus in Cattle. *J. Vet. Med.* 39:48-52.

30.- Gonda, M. A., M. J. Braun, S. G. Carter, T. A. Kost, J.W. Bess, Jr. L. G. Arthur & M. J. Vander Maaten. 1987. Characterization and molecular cloning of a bovine lentivirus related to human immunodeficiency virus. *Nature.* 330:388-392.



- 31.- Gupta, P., S. V. S. Kashmiri & J. F. Ferrer. 1984. Transcriptional Control of the Bovine Leukemia Virus Genome: Role and Characterization of a Non-Immunoglobulin Plasma Protein from Bovine Leukemia Virus-Infected Cattle. *J. of Virology*. 50:267-270.
- 32.- Hall, C. B., C. McBride & E. F. Walsh. 1983. Aerolized ribavirin treatment of infants with respiratory syncytial viral infection. *N. Engl. J. Med.* 308:1443-1447.
- 33.- Hatta, T., S. G. Kim, H. Nakasima, N. Yamamoto, K. Sakamoto, S. Yokoyama, & H. Takaku. 1993. Mechanisms of the inhibition of reverse transcription by unmodified and modified antisense oligonucleotides. *FEBS.Lett.* 330:161-164.
- 34.- Henry, E. T., J. F. Levin, & D. Coggins. 1987. Rectal transmission of Bovine Leukemia Virus in cattle and sheep. *Am. J. Vet. Res.* 48:634-636.
- 35.- Hoss, H. E. & C. Olson. 1974. Infectivity of Bovine C-type (leukemia) virus for sheep and goats. *Am. J. Vet. Res.* 35: 633-637.
- 36.-Huang & S.J.K Kennel.. 1979. Binding of immunoglobulin G to phospholipid vesicles by sonication. *Biochemistry*. 1703-1707.
- 37.-Ibañes M., P.Garilio , P. chavez, R. Santiago, C. Wong & I. Baeza. 1996. Spermidine condensed DNA and cone-shaped lipids improve delivery and

expression of exogenous DNA transfer by liposome. *Biochemistry and cell biology*. 74:633-643.

38.-Juliano R.L. & S.Akhtar.1992. Liposome as a drug delivery system for antisense oligonucleotide. *Antisens. reseaech, and developmet*2:165-176.

39.- Jensen, W.A., J. Rovnak & G. L. Cockerell. 1991. In Vivo Transcription of the Bovine Leukemia Virus tax/rex Region in Normal and Neoplastic Lymphocytes of Cattle and Sheep. *J. of Virology*. 65:2484-2490.

40.- Kettmann, R., J. Deschamps, Y. Cleuter, D. Covez, A. Burney & G. Marbaix. 1982. Leukemogenesis by Bovine Leukemia Virus: Proviral DNA integration and lack of RNA expression of viral long terminal repeat and 3' proximate cellular sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:2465-2469.

41.-Klibanov, A. L., K.Maruyama, V. P. Torchili & Huang. L. 1990. Amphipatic polyetilenglicols effectively prolong the circulation time of liposome. *FEBS.Letts*. 268:235-273.

42.- Kohlstaedt, L. A., J. Wang, J. M. Friedman, P. A. Rice, & T. A. Steitz. 1992. Crystal Structure at 3,5 Å Resolution of HIV-1 Reverse Transcriptase Complexed with an Inhibitor. *Science*. 256:1783-1789.

43.-Kuosmanne M. & H. Poso. 1985. Inhbition of the activity of restriction endonucleases by spermidine and spermine. *FEBS*. 197.17-20

- 44.- Lagarias, M. D. & K. Radke. 1989. Transcriptional Activation of Bovine Leukemia Virus in Blood Cells from Experimentally Infected, Asymptomatic Sheep with Latent Infections. *J. of Virology*. **63**:2099-2107.
- 45.- Larios, G. E. & M. B. Monroy. 1985. Complejo leucosis-linfosarcoma. Estudio epidemiológico en bovinos pardo-suizo. Primera Conferencia Internacional sobre ganado lechero. México, D. F.
- 46.- Lascano, A., V. Valverde., G. Hernandez., P. Garilio., G. E. Fox., & J.Oro. 1992. On the early emergence of reverse trasciption: theoretical basis and experimental evidence. *J.Mol.Evol.* **35**:524-536.
- 47.-Lauroskey Y., S.Chen & Roy A.K. 1997. Therapeutic potential and mechanic of action of oligonucleotide and ribozymes. *Biochem Mol Med.* **62** (1)11-22.
- 
- 48.- Lisziewicz, J., D. Sun, V. Metelev, P. Zamecnik, R. C. Gallo, & S. Agrawal. 1993. Long-term treatment of human immunodeficiency virus-infected cells with antisense oligonucleotide phosphorothioates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**:3869-3864.
- 49.- Lisziewicz, J. D., D. Sun, M. Klotman, S. Agrawal, P. Zamecnik, & R. C. Gallo. 1992. Specific inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by antisense oligonucleotide: an in vitro model for treatment. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**:11209-11213.

50.- Lo, K.M. , M.A. Biasolo, G. Dehni, G. Palu, & W.A. Haseltine. 1992. Inhibition of replication of HIV-1 by retroviral vectors expressing tat-antisense and anti-tat ribozyme RNA. *Virology*. 190: 176-183.

51.- Mamoun, R. Z., T. Astier-Gin, R. Kettmann, J. Deschamps, N. Rebeyrotte & B. J. Guillemain. 1985. The px region of the Bovine Leukemia Virus is transcribed as a 2.1 kilobase mRNA. *J. of Virology*. 3:625-629.

52.- Miller, J. M. & M. J. Van Der Maaten. 1977. Use of glycoprotein antigen in the immunodiffusion test for Bovine Leukemia Virus antibodies. *European Journal Cancer*. 13: 1369-1375.

53.- Miller, J. M. 1988. Cultivation methods for production of Bovine Leukemia Virus in and soluble viral antigens. *Journal of Tissue Culture Methods*. 11:65-69.

54.- Miller, J. M., M. J. F. Schemerr, M. J. Van Der Maaten. 1981. Comparison of four serologic test for the detection of antibodies to Bovine Leukemia Virus. *Am. J. Vet. Res.* 42:5-8.

55.- Meyer, J., S. Nick., T. Stamminger., F. Grummt., G. Jahn., & H. J. Lipps. Inhibition of HIV-1 replication by high-copy-number vector expressing antisense RNA for reverse transcriptase. *Gene*. 129:263-268.

- 56.- Mirsky, M.L., Y. Da & H.A. Lewin. 1993. Detection of Bovine Leukemia virus Proviral DNA in Individual Cells. *PCR Methods and Application*. 2:333-340.
- 57.- Monroy, B. J., T. F. Trigo, G. F. Lanus, M. R. Fajardo, & M. R. Marquez. 1985. Estudio seroepidemiológico de leucosis bovina en México. Primera Conferencia Internacional sobre ganado lechero. México, D. F.
- 58.- Mok, J. Q., & A. E. Ades. 1987. Infants born to mothers seropositive for Human Immunodeficiency Virus. *Lancet*. 2:1164-1167.
- 59.- Murovska, MF., LG. Chernobayeva, OI. Miroshnichenko, VP. Tomsons, VV. Konicheva, SV. Ivanova, & TI. Tikhonenko. 1992. An Investigation of the effect of antisense RNA gene on bovine leukaemia virus reproduction in cell culture. *Vet-Microbiol*. 33:361-366.
- 60.- Murtaugh, M. P., G. F. Lin, D. L. Haggard, A.F. Weber & J. C. Meiske. 1991. Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. *J. of Virological Methods*. 33:73-85.
- 61.- Nagel, K. M., S. G. Holstad, & E. Isenger. 1993. Oligonucleotide pharmacotherapy: an antegenic strategy. *Pharmacotherapy*. 13:177-188.

- 62.- Nielsen, S. B., E. Piper Charles, & J. F. Ferrer. 1978. Nature mode of transmission of Bovine Leukemia Virus: Role of Bloodsuking insects. *Am. J. Vet. Res.* 3:1089-1092.
- 63.- Nomokonova, N. Iu., V. V. Gorn, & V. V. Vlasov. 1993. [ In vitro supression of translation of tick-borne encephalitis virus RNA using antisense nucleotides . *Mol. Biol. Mosk.* 27:327-334.
- 64.- Offensperger, W. B., S. Offensperger, E. Waltwr, K. Teubner, G. Igloi, H. E. Blum, & K. W. Gero. 1993. In vivo inhibition of duck hepatitis B virus replication and gene expression by phosphorothioate modified antisense olideoxynucleotides.
- 65.- Okada, K., H. Yohei, A. Yoko & O. Kan-Ichi. 1991. In situ Hybridization for the Demonstration of Bovine Leukemia Virus Transcripts in Lymphosarcoma Cells Using Biotinylated Probes. *J. Vet. Med.* 38:707-713.
- 66.- Olson, C., J. M. Miller, L. D. Miller, & K. G. Guillette. 1970. C-Type virus and lymphocytic nuclear projections in bovine limphosarcoma. *J. A. V. M. A.* 156:1880-1883.
- 67.-Olson, C., H. E. Hoss, J. M. Miller, & L. E. Baumgartener. 1973. Evidence of bovine C-type ( Leukemia ) Virus in Daity cattle. *Am. J. Vet. Res.* 34:355-357.

- 68.- Rice, R. N., R. M. Stephens, A. Burney & R. V. Gilden. 1985. The gag and pol genes of Bovine Leukemia Virus: *Nucleotide sequence and analysis Virology*. **142**:357-377.
- 69.-Rice, N. R., S. L. Simex, G. C. Dubois, S. D. Showalter, R. V. Gilden & R. M. Stephens. 1987. Expression of the Bovine Leukemia Virus X Region in virus-infected cells. *J. of Virology*. **61**:1577-1585.
- 70.- Rittner, K., C. Burmester., & G. Sczakiel. 1993. In vitro selection of fast-hybridizing and effective antisense RNAs directed against the human immunodeficiency virus type I. *Nucleic.Acids.Res.* **21**:1381-1387.
- 71.- Ropert, C., M.Lavignon., C.Duubernet., P.Couvreur & C.Malvy. 1992. Oligonucleotides encapsulated in pH sensitive liposomes are efficient toward Friend retrovirus. *Biochem.Biophysis .Res.Commun.* **183**:879-885.
- 72.- Sagata, N., T. Yasunaga , Y. Ogawa, J. Tsuzuku -Kawamura & Y. Ikawa. 1984. Bovine leukemia virus: Unique structural features of its long terminal repeats and its evolutionary relationship to human T-cell leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.USA* **81**:4741-4745.
- 73.- Sagata, N., T. Yasunaga, J. Tsuzuku-Kawamura, K. Ohishi, Y. Ogawa & Y. Ikawa. 1985. Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: Its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**:677-681.

74.- Sagata, N., J. T. Kawamura, M. N. Aida, F. Shimizu, K. Imagawa & Y. Ikawa. 1985. Identification and some biochemical properties of the major XBL gene product of Bovine Leukemia Virus. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**:7879-7883.

75.- Sagata, N., T. Yasunaga & Y. Ikawa. 1985. Two distinct polypeptides may be translated from a single spliced mRNA of the X genes of human T-cell Leukemia and Bovine Leukemia Virus. *F. E. B. S.* **192**:37-42.

76. Senior J., J.A. Waters & Gregory Gregoriadis. 1986. Antibody-coated liposomes :The role of non-specific antibody adsorption. *FEBS.* **1**:54-58.

77.- Sczakiel, G., M. Oppenlander, K. Rittner, & M. Pawlita. 1992. Tat- and Rev-directed antisense RNA expression inhibits and abolishes replication of human immunodeficiency virus type 1: a temporal analysis. *J. Virol.* **66**:5576-5581.

78.- Sczakiel, G., M. Homann., & K. Rittner. 1993. Computer-aided search for effective antisense RNA target sequences of the human immunodeficiency virus type 1. *Antisense .Res.Dev.* **3**:45-52.

79.- Shayakhmentov D., D. Kovalenko, G. Yurov, A. Birisenko, & T. Tikchonenko. 1997. Use of the bovine leukemia virus LTR U3 promoter for expressing antisense antiviral RNAs and competitive inhibition of viral infection in cell culture. *Jurnal General of Virology* **78** 1941-1948.



80.- Sherman, M. P., G. D. Ehrlich, J. F. Ferrer, J. J. Sninsky, R. Zandomeni, N. L. Dock & B. J. Poiesz. 1992. Amplification and Analysis of Specific DNA and RNA Sequences of Bovine Leukemia Virus from Infected Cows by Polymerase Chain Reaction. *J. of Clin. Microbiol.* **30**:185-191.

81.- Stein, C. A., & C. Cheng. 1993. Antisense oligonucleotides as therapeutic agent is the bullet really magical. *Science.* **261**:1004-1012.

82.- Stott, M.L., M. C. Thurmond, S. J. Dunn, B. I. Osburn & J. L. Stott. 1991. Integrated bovine leukosis proviral DNA in helper and T cytotoxic/suppressor lymphocytes. *J. of General Virology.* **72**:307-315.

83.- Suinarchuk, F. P., D. A. Konevets, O. A. Pliasunova, A. G. Pokrovsky, & V. V. Vlasov. 1993. Inhibition of HIV proliferation in MT-4 cells by antisense oligonucleotide conjugated to lipophilic groups. *Biochimie.* **75**:49-54.

84.- Sullivan, S. M., R. K. Gieseler, S. Lenzner, J. Ruppert, T. G. Gabrysiak, J. H. Peters, G. Cox, L. Richer, W. J. Matin, & M. J. Scolaro. 1992. Inhibition of human immunodeficiency virus-1 proliferation by liposome-encapsulated sense DNA to the 5' tat splice acceptor site. *Antisense. Res. Dev.* **2**:187-197.

- 85.- Tang , J. Y., J. Temsamani, & S. Agrawal. 1993. Self-stabilized antisense oligodeoxynucleotide phosphorothioates: properties and anti-HIV activity. *Nucleic. Acids. Res.* 21:2729-2735.
- 86.- Tochikura,T., Iwahashi,M., Matsumoto, T., Koyanagi,Y., Hinuma, Y., & Yamamoto,N. 1985. Effect of the human serum anti-HTLV-I antibodies on viral antigen induction in *in vitro* cultured peripheral lymphocytes from adult T-cell leukemia patients and healthy virus carriers. *International Journal of the cancer* 36:1-7.
- 87.-Torchilin V. P., B. A. Khaw, V. N. Smirnov & E.Haber.1979. Preservation of antimyosin antibody activity after covalent coupling to liposome. *Biochem. Biophys.Res. Comm.* 4:1114-1119
- 88.- Tuerk, C., S. MacDougal, & L. Gold. 1992. RNA pseudoknots that inhibit human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89:6988-6992.
- 89.-Weissman G., D. Bloomgarden, R.Kaplan. C.Cohen, S. Hopfftein, T. Collins, A. Gotlieb, & D. Nagle. 1974. General method for the introduction of enzymes, by means of immunoglobulin-coated liposomes, into lysosomes of deficient cells. *Proc Natl.Acad.Sci.USA.*1:88-92
- 90.Wildmann, C. Goldman J. M., & Michaux J. L.. 1993. Retrovirally transduced antisense sequence stably suppress P210BCR-ABL expression

and inhibit the proliferation of BCR/ABL-containing cell lines. *Blood*. 81:502-509.

91.- Ye, X., M.Wu. 1992. Retrovirus mediated transfer of antisense human c-myc gene into human esophageal cancer cells suppressed cell proliferation and malignancy. *Sci. China. B*. 35:76-83.

92.- Yoshinaka, Y., K. Iyoko, D. C. Terry, S. W. Gary & O. Stephen. 1986. Bovine Leukemia Virus Protease: Purification, Chemical Analysis, and In Vitro Processing of gag Precursor Polyproteins. *J. of Virology*. 57:826-832.

93.- Zandomeni, R.O., M. Carrera-Zandomeni, E. Esteban, W. Donawick & J. F. Ferrer. 1992. Induction and inhibition of bovine leukaemia virus expression in naturally infected cells. *J. of General Virology*. 73:1915-1924.

94.- Zapata, B. P., L. Trejo, R. Avalos, A. Lara, R. Tamez, & A. Beltrán. Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la leucosis bovina en 22 municipios de la región noreste de México. Enviado para publicación. *Revista Veterinaria*. México.

95.- Zhengxian, G., Q. Gao., X.Li., M.A.Parniak., & M.A.Wainberg. 1992. Novel mutation in the human immunodeficiency virus type I reverse transcriptase gene that encodes cross-resistance to 2',3'-dideoxycytidine and 2',3'-dideoxycytidine. *J. Virol.* 66:7128-7135.

## APENDICE A

### PREPARACION DE REACTIVOS UTILIZADOS EN BIOLOGIA MOLECULAR

**Acetato de sodio 3 M pH 5.2 ó 4.5.-** Disolver 246.09 g de acetato de sodio anhidro en 700 ml de agua bidestilada, ajustar el pH y aforar a 1 litro. Esterilizar por autoclave.

**Acrilamida-Bisacrilamida 30%.-** Disolver 29 g de acrilamida y 1 g de bisacrilamida en 50 ml de agua bidestilada y aforar a 100 ml. Filtrar en membrana milipore de 0.45 mm. Almacenar a 4°C en un recipiente cubierto con papel aluminio.

**Agarosa 0.8% en solución balanceada de TAE.-** Disolver 0.81 g de agarosa en 99 ml de solución TAE.

**Agar Luria-Bertani.-** Disolver los ingredientes anteriores, además pesar 15 g de agar-agar, disolver, ajustar el pH a 7 y esterilizar en autoclave a 15 lb/pulg<sup>2</sup>.

**Alfa-metil-D-manosidasa ( AMDM ).-** Disolver 19.42 g de AMDM en 800 ml de agua bidestilada y aforar a un litro.

**Alcohol etílico 70%.-** Mezclar 700 ml de etanol absoluto y 300 ml de agua bidestilada, almacenar en refrigeración.

**Ampicilina 250 mg/ml.-** Disolver 0.5 g de ampicilina en 2 ml de agua bidestilada estéril, ( tomar 40  $\mu$ l para 100 ml de medio ) almacenar en refrigeración.

**Azul de Coomassie 0.25%.-** Disolver 0.25 g de azul de coomassie en 40 ml de metanol, 10 ml de ácido acético glacial y 50 ml de agua bidestilada, almacenar a temperatura ambiente.

**Bicarbonato de sodio 4.4%.-** Depositar 500.0 ml de agua bidestilada en un frasco limpio y seco, agregar 44.0 g de bicarbonato de sodio, agregar 0.5 ml de rojo fenol 1%, aforar a un litro, añadir 10 g de bióxido de carbono sólido, agitar constantemente hasta que el indicador vire a color canela pálido ( pH- 7.1- 7.3 ). Esterilizar en autoclave a 110°C durante 20 min.

**Bromuro de Etidio 0.5mg/ml.-** Disolver 50 mg de bromuro de etidio en 80 ml de agua bidestilada y aforar a 100 ml, almacenar a 4°C en un recipiente ambar para protegerlo de la luz, de esta solución se hará una dilución de 1:1000 para teñir los geles

**Caldo Luria-Bertani.-** Disolver 10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl, en 300 ml de agua bidestilada y aforar a 1 litro, ajustar el pH a 7 y esterilizar en autoclave a 15 lb/pulg<sup>2</sup> por 20 minutos.

**Cloruro de sodio 8.5%.-** Disolver 85 g de NaCl en 500 ml de agua destilada y aforar a un litro.

**Cloruro de sodio (NaCl) 5M.-** Disolver 292.2 g de NaCl en 800 ml de agua bidestilada y aforar a un litro, esterilizar por autoclave.

**Fenol saturado.-** El fenol que se va a destilar se puede recibir en un pequeño volumen de Tris-HCl 1M para evitar su cristalización, para la saturación siga los siguientes pasos:

- 1.- Fundir el fenol.
- 2.- Destilar ( se produce a destilar el fenol si el aspecto de este al estar fundido, no es cristalino ), el fenol destila a una temperatura de 180°C, es recomendable no conectar agua circulante porque puede cristalizarse en el mismo refrigerante, antes de comenzar la saturación, el fenol debe ser equilibrado a un pH mayor de 7.8 con hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1% ( función antioxidante ).
- 3.- Añadir 1 volumen de solución amortiguadora Tris-Hcl 0.5M pH y mezclar con una barra magnética hasta que el pH de la fase fenólica sea mayor de 7.8 ( medir con papel indicador ).
- 4.- Dejar que se separen las fases y eliminar la fase acuosa utilizando una pipeta conectada a una línea de vacío con trampa o un embudo de separación.
- 5.- Repetir la misma operación pero utilizando solución amortiguadora de tris-HCl 0.1 M pH8.
- 6.- Eliminar la fase acuosa final y añadir 0.1 volumen de 0.1 m Tris-HCl pH 8 conteniendo 0.2 % de mercaptoetanol.

7.- La solución de fenol puede ser almacenada de esta forma en un recipiente ambar a  $-20^{\circ}\text{C}$ , las alícuotas de fenol en uso se almacenan a  $4^{\circ}\text{C}$ .

**Gel de acrilamida para RNA.-** Mezclar 3.9 g de urea, 1.45 ml de acrilamida, 1.9 ml de TBE 5X, 0.1 ml de PSA, 5  $\mu\text{l}$  de TEMED y 3.25 ml de agua bidestilada

**Hidróxido de sodio ( NaOH ) 10 M.-** Disolver 400 g de NaOH anhidro en agua bidestilada y aforar a 1 litro

**Jugo azul 6X ( contiene 0.25% de azul de bromofenol, 0.25 % de xilencianol y 30 % de glicerol ).-** Mezclar 20 mg de xilencianol, 25 de azul de bromofenol y 3.0 ml de glicerol, aforar a 10 ml con agua bidestilada.

**Lauril sulfato de sodio (SDS) 10 %.-** Disolver 10 g de SDS en 90 ml de agua bidestilada.

**PBS 1X.-** Disolver en 500 ml de agua bidestilada 160 g de cloruro de sodio ( NaCl ), 4 g de cloruro de potasio ( KCl ), 28.8 g de fosfato dibásico de sodio (  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ) y fosfato monobásico de potasio (  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ), aforar a 1 litro, esterilizar en autoclave a  $110^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos. Almacenar en refrigeración.

**Persulfato de amonio 10 %.-** Disolver 1 g en 9 ml de agua bidestilada, conservar a  $4^{\circ}\text{C}$  en un recipiente ambar.

**Proteinasa K 10µg/ml.-** Disolver en alícuotas de 500 µl y almacenar a -20°C.

**Medio esencial mínimo de crecimiento ( MEMC).**-Tomar 50 ml de SS MEM y depositarlos en un frasco de 100 ml, adicionar 8 ml de suero fetal bovino ( SFB ), 4 ml de bicarbonato de sodio 4.4% estéril, 100 µl de PES estéril, aforar a 100 ml con agua tridestilada estéril. Para la preparación del medio esencial mínimo de mantenimiento (MEMM), tomamos lo mismo que para el MEMC solo que se le adiciona 5 ml de SFB en lugar de 8 ml.

**Medio esencial mínimo para congelación (MEMF).**- Tomar 50 ml de SS MEM, depositarlos en un frasco estéril de 100 ml, adicionar 20 ml de SFB, 4 ml de bicarbonato de sodio 4.4% estéril, 100 µl de PES estéril, 10 ml de dimetil sulfoxido ( DMSO ), aforar a 100 ml con agua tridestilada estéril..

**Medio RPMI-1640 de crecimiento (MRC).**- Tomar 50 ml de SS MR y depositarlos en un frasco de 100 ml, adicionar 10 ml de suero fetal bovino ( SFB ), 4 ml de bicarbonato de sodio 4.4% estéril, 100 µl de PES estéril, aforar a 100 ml con agua tridestilada estéril.

**SDS 0.1 %.-** Tomar 1 ml de SDS 10% y aforar a 20 ml con agua destilada.

**SDS 1%.-** Tomar 1 ml de SDS 10% y aforar a 10 ml con agua destilada.

**Solución balanceada de tris 1.0 M.-** Disolver 121.1 g de tris Hcl, en 300 ml de agua bidestilada y aforar a 1 litro, ajustar a pH 6.8.



**Solución de lisis.-** Mezclar 1 ml de TNE pH 8, 10  $\mu$ l de proteinasa K, 50  $\mu$ l de SDS al 20% y 50  $\mu$ l de EDTA 500 mM.

**Solución de  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.1 M.-** Disolver 54 g de  $\text{CaCl}_2$  en 100 ml de agua bidestilada y aforar en 200 ml, esterilizar por filtración con membrana milipore 0.22  $\mu$ m.

**Solución I de minipreparación de plásmidos ( 2 mg/ml de lisozima, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, tris-HCl 25 mM pH 8.0 ).-** Se mezclan 5 ml de glucosa 1 M, 2 ml de EDTA 500 mM, 1.25 ml de Tris-HCl 2M pH 8.0 y 91.75 ml de agua bidestilada. Esterilizar por autoclave y antes de usar disolver 2 mg de lisozima por cada ml a usar.

**Solución II de minipreparación de plásmidos ( NaOH 0.2 N, SDS al 1% ).-** Se mezclan 200  $\mu$ l de NaOH 10 N, 8.8 ml de agua bidestilada estéril y 1 ml de SDS al 10 %. Se prepara al momento de usar.

**Solución III de minipreparación de plásmidos ( acetato de potasio 3 M, ácido acético 2 M ).-** Se mezclan 60 ml de acetato de potasio 5 M, 28.5 ml de agua bidestilada y 11.5 ml de ácido acético glacial. Esterilizar por autoclave.

**Solución stock de medio esencial mínimo (SSMEM).-** Disolver 13.4 g de medio esencial DULBECOS en 200 ml de agua tridestilada, aforar a 500 ml, esterilizar por filtración con una membrana de poro 0.22  $\mu$ m, con esto tenemos una solución de medio al 2X.

**Solución stock de medio RPMI-1640 (SSMR).**- Disolver 10.4 g de medio RPMI-1640 en 200 ml de agua tridestilada y aforar a 500 ml. Esterilizar por filtración con una membrana de poro 0.22  $\mu\text{m}$ , con esto tenemos una solución de medio al 2X.

**Solución A de sulfato de cobre 5% para cuantificación de proteínas.**- Disolver 1 g de sulfato de cobre en 20 ml de agua

**Solución B de tartrato de sodio y potasio 10% para cuantificación de proteínas).**- Disolver 2 g de NaKTartrato en 20 ml de agua.

**Solución C de NaOH 0.5 N para cuantificación de proteínas.**- Disolver 2 g de NaOH en 100 ml de agua destilada.

**Solución de Folin.**- Mezclar 1 ml de reactivo de fenol Folin-Ciocalteu con 1 ml de NaOH 1 N.

**Solución de tártrato de cobre 5X.**- Mezclar las soluciones A, B y C en relación 1:1:100.

**Solución de substrato de diaminobenzidina 0.05%.**- Disolver 20 mg de 3,3 Diaminobenzidina en 40 ml de PBS A 1X.

**Solución bloqueadora de TBS-TWEEN 2.5% para inmunodetección.-** Disolver 2.5 ml de Tween-20 con 20 ml de solución de TBS y aforar a 100 ml.

**Solución de lavado de TBS-TWEEN 0.05 % para inmunodetección en placas de ELISA y en membrana de nitrocelulosa.-** Disolver 50 µl de Tween-30 con 20 ml de solución TBS y aforar a 100 ml.

**Solución bloqueadora para ELISA TBS-TWEEN 0.15%.-** Disolver 0.15 ml de Tween-20 con 30 ml y aforar a 100 ml.

**Solución de lisis para DNA.-** Tris-HCl 10 mM pH 8, NaCl 10 mM y EDTA 10 mM

**Solución de lavado tipo A para purificación de IgG.-** Disolver 7.88 g de Tris-HCl (0.5 M), 8.76 g de NaCl (0.15) M y 0.20 g de NaN<sub>3</sub> (0.02%) en 200 ml de agua destilada y aforar a un litro, la solución quedará a un pH final 8.6.

**Solución de elución tipo B para purificación de IgG.-** Disolver 37.53 g de glicina, 8.76 g de NaCl y 0.20 g de NaN<sub>3</sub> en 200 ml de agua destilada y aforar a un litro, la solución quedará a un pH final de 3.

**SEVAG ( Cloroformo- isoamílico 24:1).-** Se mezclan 40 ml de alcohol isoamílico y 960 ml de cloroformo.

**Solución balanceada de tris 1.0 M.-** Disolver 121.1 g de Tris- HCl, en 300 ml de agua bidestilada y aforar a 1 litro, ajustar a pH 6.8.

**Solución balanceada de boratos 5X.-** Mezclar 54g de trizma base, 27.5 g de ácido bórico y 2 ml de EDTA 0.5 M y aforar a un litro.

**Solución decolorante.-** Mezclar 100 ml de metanol, 100 ml de ácido acético glacial con 800 ml de agua bidestilada.

**Solución fijadora.-** Mezclar 400 ml de metanol, 100 ml de ácido acético glacial con 500 ml de agua bidestilada.

**Solución de corrimiento para electroforesis 10X.-** Disolver en 600 ml de agua bidestilada 144.1 g de glicina, 30.2 g de tris-base y 10 g de SDS, aforar a un litro.

**Solución de muestras para electroforesis.-** Disolver 0.92 de SDS , 2ml de B- mercaptoetanol, 4 g de glicerol, 0.3 g de tris-base y 2.0 ml de azul de bromofenol 0.1% en 10 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 6.8 con Hcl y aforar a 20 ml.

**Solución balanceada para el gel concentrador.-** Disolver 6.055 g de tris-base y 2µl de SDS 20% en 70 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 6.8 con HCl y aforar a un litro.

**Solución balanceada para el gel separador.-** Disolver 18.165 g y 2 µl de SDS 20% en 70 ml de agua bidestilada, ajustar el pH a 8.8 con Hcl, aforar a un litro.

**Solución de EDTA 0.05%.-** En un frasco limpio y seco mezclar 50 ml de PBS A con agua, agregar 0.5 g de EDTA, agitar hasta que se disuelva por completo y ajustar el pH a 7.6 con NaOH 1 N. Esterilizar en autoclave a 110° durante 20 min.

**Solución de penicilina-estreptomina (PES) ( concentraciones finales de 100,000UI/ml y 100,000 µg/ml )-.** Disolver 1,000,000 ( 0.6 g aproximadamente ) de penicilina G ( sal disódica ) y 1 g de estreptomina dihidratada en 5.0 ml de agua destilada cada uno, mezclar las soluciones y esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.22 µm.

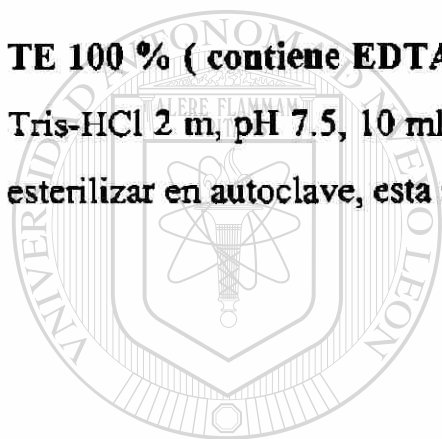
**Rojo fenol 1%.-** Depositar 10 g de rojo fenol en un matraz de un litro, agregar 570 ml de agua destilada y 30 ml de NaOH 1 M agitar durante 2 hr a temperatura ambiente y aforar a un litro, filtrar en papel whatman No. 2, esterilizar en autoclave a 110°C durante 10 min.

**RNAasa libre de Dnasas 10 mg/ml.-** Disolver 100 mg de RNAasa en 9.92 ml de agua bidestilada estéril, 50 ml de Tris-HCl 2 M pH 7.5 y 30 µl de NaCl 5 M, se incuba a ebullición por 20 minutos, se deja enfriar lentamente a temperatura ambiente, dividir en alicuotas y almacenar a - 20 °C.

**TAE 50% ( contiene EDTA 100 mM, Tris-Acetato 2 M pH 5.0).-** Disolver 242.2 g de base trizma en 400 ml de ácido acético glacial, ajustar a 100 ml de EDTA 500 Mm y 57.1 ml de ácido acético glacial, ajustar a pH 8 y aforar a 1 litro, esterilizar en autoclave.

**TBE 10% (contiene Tris-Borato 0.089 M, ácido bórico 0.089 M).-** Mezclar 5.400.0 g de base trizma y 2750.0 g de ácido bórico en 1 litro de solución EDTA 500mM pH 8.

**TE 100 % ( contiene EDTA 100 mM y Tris-HCl 1 M ).-** Mezclar 25 ml de Tris-HCl 2 m, pH 7.5, 10 ml de EDTA 500 mM y 15 ml de agua bidestilada, esterilizar en autoclave, esta solución se usa normalmente a 1X.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

# TRANSCRIPTASA REVERSA

## EL KIT CONTIENE

- 1.- **TRANSCRIPTASA REVERSA HIV-1 ( VIAL VIOLETA)** Contiene 500 ng de T-R recombinante ,usa poly ( A ) . oligo (dt) como templete /primer híbrido.
- 2.- **SOLUCION DE INCUBACION ( TAPA AZUL)** Un frasco contiene 5 ml de solución amortiguadora pH 7.8 y es usado para preparar la mezcla de reacción.
- 3.- **NUCLEOTIDOS (TAPA AZUL).** Cuatro viales que contiene **dUTP-DIG** (digoxigenina), **dUTP-Biotina** y **dTTP**.
- 4.- **TEMPLETE (TAPA SIN COLOR)** Contiene poly ( A ) oligo (dt) liofilizado
- 5.- **SOLUCION DE LISIS (TAPA SIN COLOR)** Bote de polietileno que contiene 25 ml de bufer listo para su uso ,es usado para la lisis de los viriones y para la dilación de la R-T HIV.
- 6.- **ANTI-DIGOXIGENINA-PEROXIDASA (TAPA ROJA).** Un frasco contiene 10 U anti-DIG-POD, un anticuerpo para digoxigenina que es conjugado para peroxidasa liofilizado.
- 7.- **SOLUCION DE LAVADO CONCENTRADO (10 X) (TAPA SIN COLOR)** 3 frascos de 25 ml
- 8.- **SOLUCION DE DILUCION DE CONJUGADO (TAPA ROJA )** . Un frasco que contiene 75 ml de solución de dilución.
- 9.- **SOLUCION DE SUSTRATIO (TAPA VERDE).** Bote de plástico que contiene 125 ml de solución.

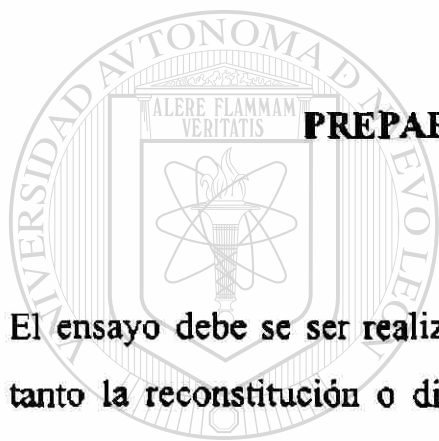
**10.- ABTS SUSTRATO(TAPA VERDE).** Frasco que contiene 125 mg de sustrato.

**11.- SUSTRATO ENHANCER (TAPA BLANCA )** Frasco que contiene 150 mg de sustrato.

**12.- MODULOS DE 8 POZOS DE MICROPLACAS .** son 7 bolsas que contiene 4 módulos de 8 pozos, los pozos son precubiertos con streptavidina.

**13.- ESTRUCTURA PARA LA INSERCIÓN DE LOS MODULOS.**

**14.- 10 CUBIERTAS PARA LA MICROPLACAS.**



## **PREPARACION DE SOLUCIONES**

El ensayo debe ser realizado bajo condiciones libres de nucleasas por lo tanto la reconstitución o dilución de los componentes del kit debe de ser autoclaveado y/o DPC o Velcorin y el uso de puntillas pipetas y viales deben ser esterilizadas y se deberán usar guantes para la realización del ensayo.

### **SOLUCION I . HIV -1 REVERSE TRENSCRIPTASA**

Se disuelve el liofilizado del vial 1 (tapa violeta) en 250  $\mu$ l de agua estéril (concentración final 2 ng/ $\mu$ l que corresponde a 10 mU/ $\mu$ l) almacenar en alíquotas a  $-20^{\circ}\text{C}$  o  $-70^{\circ}\text{C}$ . Con 10  $\mu$ l se puede realizar una curva de calibración.

### **SOLUCION II. MEZCLA DE REACCION**



Mezcla de reacción usando poly (A) oligo (dt) reconstituya el templete (vial 4) en 430  $\mu$ l de agua. Adicionar 1 ml solución de incubación (vial 2 tapa azul) por vial de nucleotidos (vial 3 tapa azul). Adicionar 100  $\mu$ l de reconstituyente de templete para cada vial conteniendo la solución de nucleotidos para obtener una mezcla de reacción lista para su uso a una concentración final :Tris Hcl, 50 mmol/l; Kcl 290 mmol/l; MgCl<sub>2</sub> 30mmol/l; DTT,10 mmol/l; dUTP10 mmol/l; templete 750 A<sub>260nm</sub>/ml.

### **SOLUCION III. SOLUCION DE INCUBACION.**

Vial 2 tapa azul, listo para su uso.

### **SOLUCION IV. SOLUCION DE LISIS.**

Bote 5 tapa sin color listo para su uso

### **SOLUCION V.ANTI-DIG-PEROXIDASA (ANTI-DIG-POD)**

Disolver el lisado del vial 6 (tapa roja ) en 0.5 ml de agua que da una concentración final de 20U/ml.

### **SOLUCION Va. dilución de trabajo**

se diluye la solución V (20U) con dilución de conjugado (bote 8 tapa roja) a una concentración final de 200 nU/ml (50 $\mu$ l de solución V + 4.95ml de solución de conjugado) .Se recomienda prepararla inmediatamente antes de su uso se requiere 200 $\mu$ l de solución de trabajo por pozo.

### **SOLUCION VI. SOLUCION DE LAVADO**

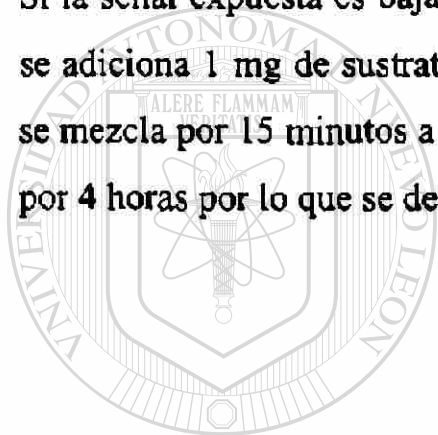
Se adiciona 225 ml de agua al bote 7 tapa sin color.

### **SOLUCION VII. POD SUBSTRATO**

Se disuelve el sustrato del vial 10 (tapa verde) en solución de sustrato (bote 9 tapa verde) y se mezcla para que este lista para su uso.

### **SOLUCION VII<sub>a</sub> POD SUBSTRATO CONTENIENDO ENHANCER DE SUSTRATO.**

Si la señal expuesta es baja se toma una alicota apropiada de solución VII y se adiciona 1 mg de sustrato enhancer vial 11 (tapa blanca) por ml de POD y se mezcla por 15 minutos a temperatura ambiente., esta es estable únicamente por 4 horas por lo que se debe de preparar inmediatamente antes de su uso..

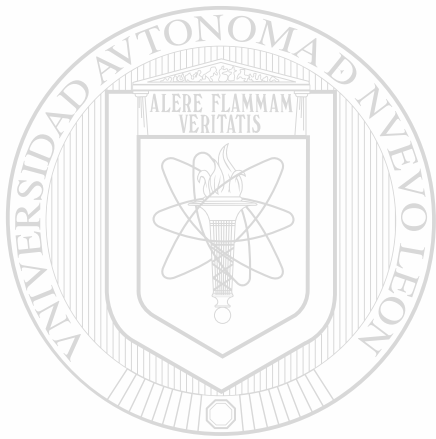


# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



