

**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**

TD  
QR375  
.Z3  
1998  
c.1



1080087093

9645

35890  
85  
8991

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
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

INHIBICION DE LA PROLIFERACION DE BLV  
CON ELEMENTOS ANTISENTIDOS LIBRES Y  
DOCTOR EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGIA EN  
ENCAPSULADOS EN LIPOSOMAS

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

MC. PABLO ZAPATA BENAVIDES

PRESENTA:

MC. PABLO ZAPATA BENAVIDES

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

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 2018

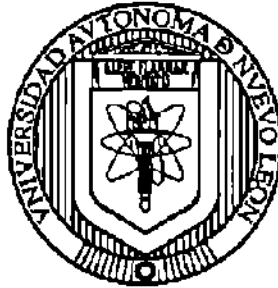
T

375

73

199

**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**

**P R E S E N T A**

**MC. PABLO ZAPATA BENAVIDES**

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

**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 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**

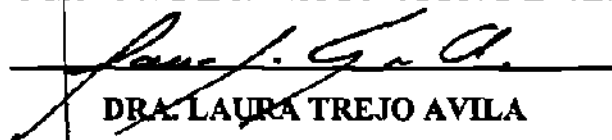


**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**  
**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**  
**DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**




**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.***

## **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.**

**Agradezco a todos mis AMIGOS su confianza y cariño hacía 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 $\beta$ -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
VII.- INHIBICION DE LA EXPRESION DE BLV POR TRANSFERENCIA DE GENES ANTISENTIDOS	72
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>	76
<b>CONCLUSIONES</b>	82
<b>PERSPECTIVAS</b>	83
<b>REFERENCIAS</b>	84
<b>APENDICE A</b>	100

## 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 fluorecentes por los inmunoliposomas marcados con fluoreceína	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**

<b>TABLAS</b>	<b>PAGINAS</b>
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

## **AREA DE TRABAJO:**

**LABORATORIO DE INMUNOLOGIA Y  
VIROLOGIA. DEL DEPARTAMENTO DE  
MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA.  
FAC. DE CIENCIAS BIOLÓGICAS U.A.N L.**