

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 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 β -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 CaCl₂ y de 29.5 por inmunoliposomas, para pVA fue de 43.6% por CaCl₂ 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.

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 linfotropico 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 (Gp51 y 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).

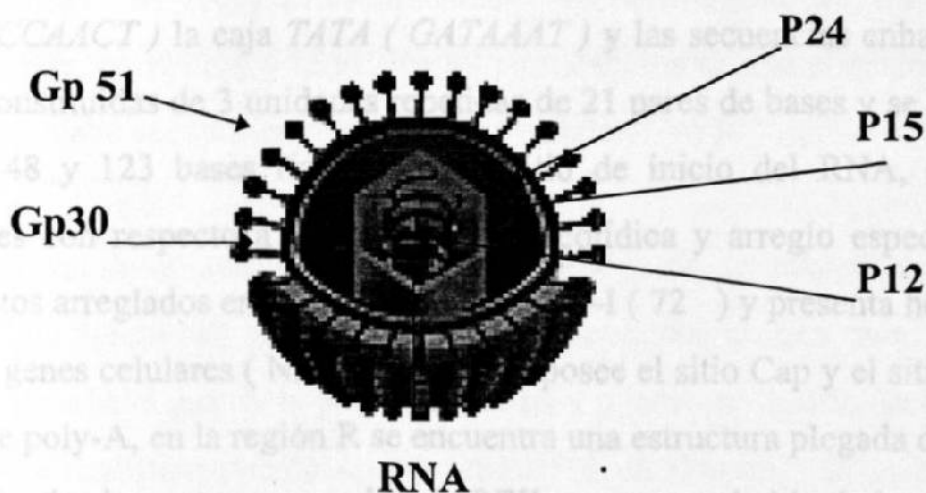
II.- CARACTERISTICAS DEL VIRUS

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

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 estan 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^{Pro} 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 NH₂-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 truncada 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^{Lys}, la de HTLV-I requiere RNAt^{Tre}, la de BLV requiere RNA t^{Pro} y la de E. coli requiere un RNAt^{Gln} (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 β 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 β 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 RNAt 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).

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 RNAm celular o viral, lo cual puede ser auxiliado con un análisis computacional (78). Una forma de selección de los RNA antisentidos es através 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).

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 μ 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 fosforotioatos 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 através 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 basados 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 distearoylfosfolípidos 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 vía 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 hidrofobicos 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 estreptomicina, 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.- Ditríotreitól, 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.

MATERIAL Y METODOS

I.- MODIFICACION Y CONSTRUCCION DE PLASMIDOS

A) TRANSFORMACION

Transformación de la cepa DH5 α de E.coli con los plásmidos originales (5-6, 3-12, pCDNA3, pRS β gal) plásmidos modificados para la transcripción “in vitro” bajo los promotores SP6 y T7 (5-6.1, 3-12.A) y los plásmidos contruidos 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 μ 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 CaCl₂ 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 μ l de CaCl₂.

2.- TRANSFORMACION

En un tubo eppendorf se colocaron 5 μ l de plásmidos en solución amortiguadora de Tris EDTA (TE), a una concentración de 1 μ g/ μ l y 20 μ 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 μ l de caldo LB sin antibiótico y se incubó a 37°C por 20 minutos. Se virió el contenido en 2 cajas Petri con agar LB con antibiótico (100 μ 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 μ 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 μ l de solución amortiguadora de tris cloruro de sodio (TS), se adicionó 200 μ 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 μ 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 restriccion.

En un tubo eppendorf se adicionó 2 μ l del plásmido (1 μ g), 1 μ l de solución amortiguadora 10X específico de la enzima, 1 μ l de enzima y 6 μ 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 μ l de bromuro de etidio (10 μ g/ml). Se vació la agarosa en el molde con el peine para hacer pozos con una capacidad de 15 μ l, se gelificó y se colocó el gel en la cámara de electroforesis, se cubrió con solución balanceada TBE. Se tomó 3 μ l de muestra y se mezcló con 1 μ l 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 μ l aproximadamente. Se tomaron 50-75 μ l de muestra y se mezclaron con 8-12.5 μ l 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 μ l de GLASSMILK por 5 μ g 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 μ l 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 10^6 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.

DIA	D O S I S	VIA
0	0.5 ml de pristane	i.p.
13	100 µg de ag-BLV/1 vol ACF*	i.p.
20	100 µg de ag-BLV	i.p.
27	500 µg de ag-BLV	i.p.
34	1X10⁶ células X-63	i.p.
38	Cosecha de líquido ascítico	i.p.

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 μ 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 alícuotas de 100 μ 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 μ g de iodogen y le adicionamos 100 μ l de proteína en una concentración de 1 mg/ml y 500 μ Ci de I^{131} , se incubó 15 minutos con agitación suave, posteriormente se le adicionó 0.25M de NaI en un volumen de 25 μ 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 fosfatídico 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 μ 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 μ g/ml de estreptomycin, 2% de bicarbonato de sodio y 0.25% de lactoalbúmina, usando frascos de cultivo de 25 cm², se incubaron a 37°C en una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂, 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 µg de DNA del plásmido y 4.5 µg de DNA de esperma de salmón como acarreador y se le adicionó 16.6 µl de cloruro de calcio al 2.5 molar, se aforó a 250 µl con solución amortiguadora TE, esta solución se adicionó suavemente en 166 µl 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 cm² de superficie, la placa se incubó por 24 horas a 37°C

con 5 % de CO₂ , 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 cm² 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 Na₂CO₃, 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.

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 ⁺ (μ l)	AGUA (μ 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

⁺albúmina bovina

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

μ l/pozo de las diluciones de proteínas totales de las células FLK-BLV (todas las muestras se colocaron por duplicado). Se agregaron 25 μ 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 μ 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 μ g en 90 μ l de agua bidestilada y 10 μ 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 μ l de una solución de 0.1% de tween 20 en PBS 1X y se le adicionó 100 μ 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 μ 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 μ l del sustrato para la peroxidasa (10 mg de OPD en solución de citrato pH5 y 30 μ l de H₂O₂), 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 H₂O₂ 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

HIV-1-R-T concentración (ng/pozo)	HIV-1R-T dilución de trabajo (0.2ng/μl)	BUFFER DE LISIS solución V
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.

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.

A) MARCAJE CON I¹³¹

Se marcaron parte de los anticuerpos con 50 μ 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 3×10^6 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 desnaturizantes 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).

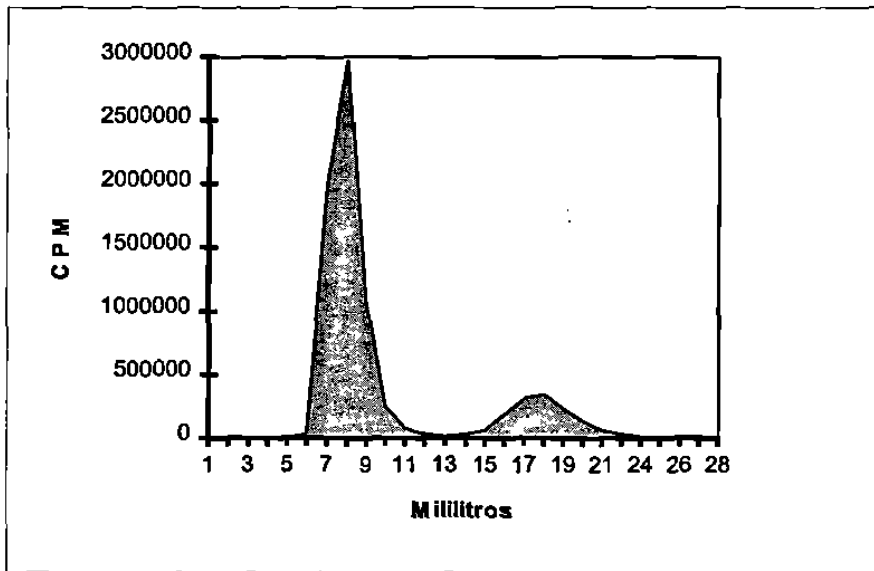


Figura 4. Purificación de los anticuerpos marcados con I^{131} . La purificación de los anticuerpos se realizó en una columna de sephadex G50.

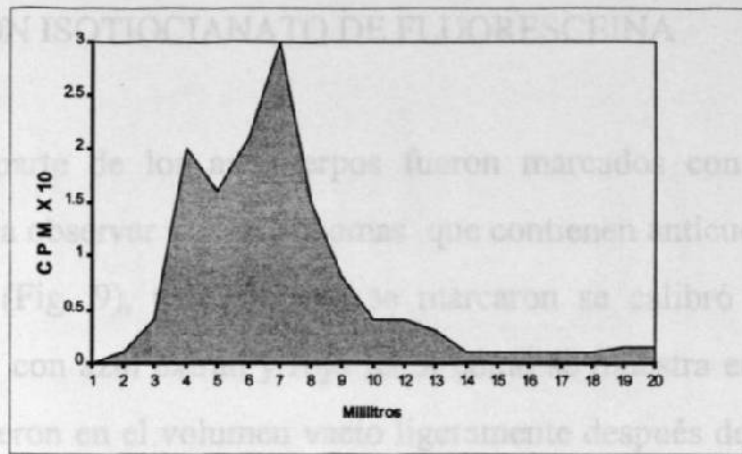


Figura 5. Purificación de los inmunoliposomas marcados con I^{131} en una columna de sefarosa 4B



← Inmunoliposomas
 ← Anticuerpos

Figura 6. Migración electroforética de los inmunoliposomas 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.

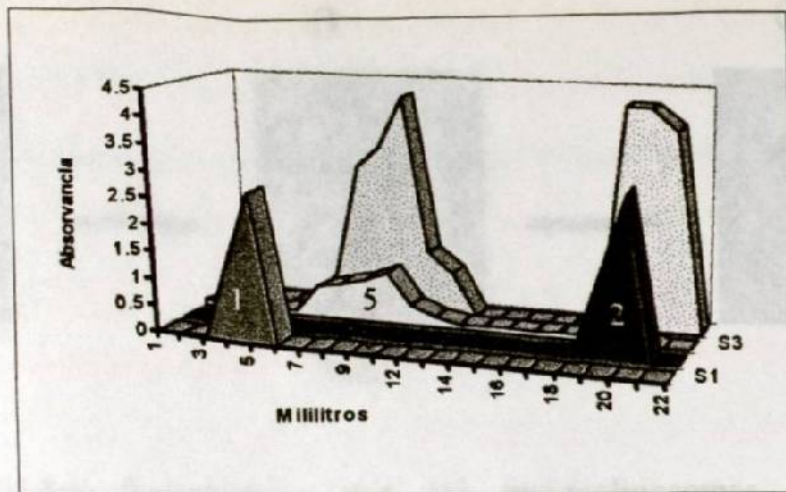


Figura 7. Calibración de la columna de sephadex G25 para la purificación de anticuerpos marcados con fluoresceína. 1.- Azul dextrán, 2.- Rojo fenol, 3.- Anticuerpos, 4.- fluoresceína y 5.- inmunoliposomas.

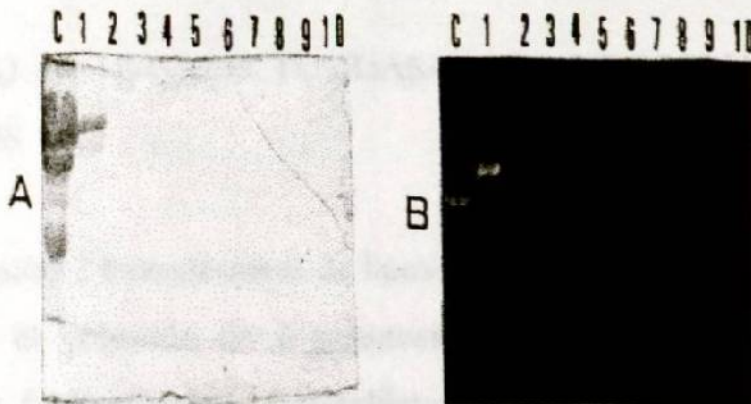


Figura 8. Corrimiento electroforetico de las IgG marcadas con fluoresceína.

A) Gel de acrilamida teñidas con azul de coomassie B) Gel de acrilamida visto en un transiluminador de UV.

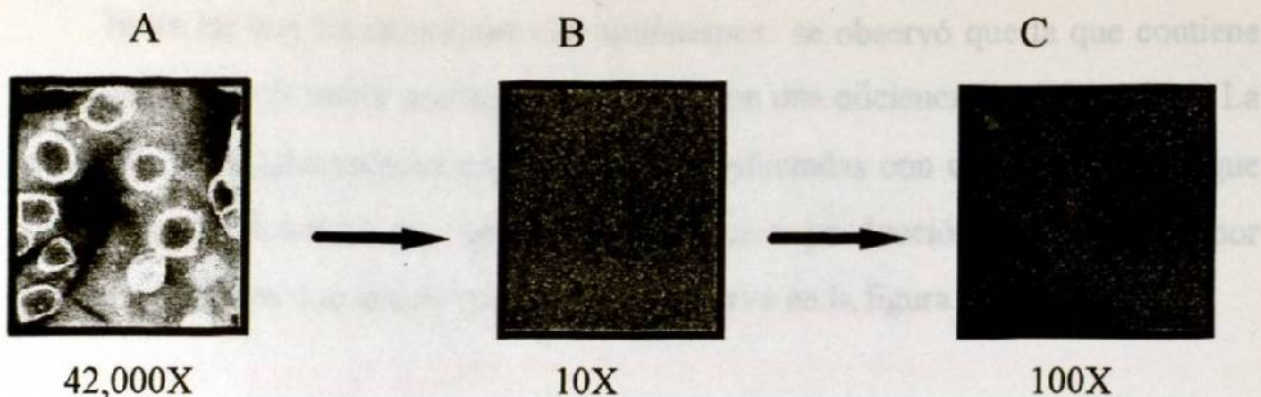


Figura 9. Células fluorescentes por los inmunoliposomas marcados con fluoresceína. A).- Inmunoliposomas observados con microscopio electrónico B).- Células incubadas 1h. con los inmunoliposomas, observadas en luz visible C).- Células fluorescentes por los inmunoliposomas observadas en microscopio de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

II ACTIVIDAD DE β -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 β -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 β -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 fosfático y colesterol en una relación molar 5 :4 :1, se obtuvieron 4 unidades de β -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 β -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.

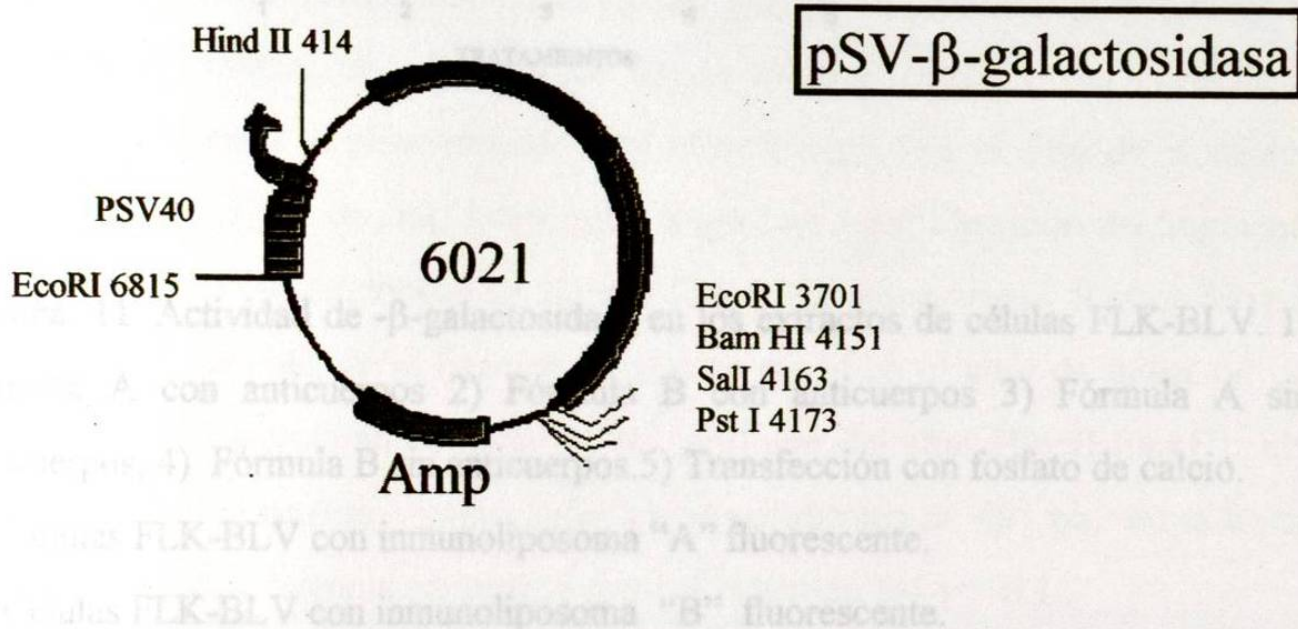


Figura 10. Mapa del plásmido pSv- β -galactosidasa

III- CONSTRUCCION DE PLASMIDOS PARA LA SINTESIS DE ANTISENTIDOS

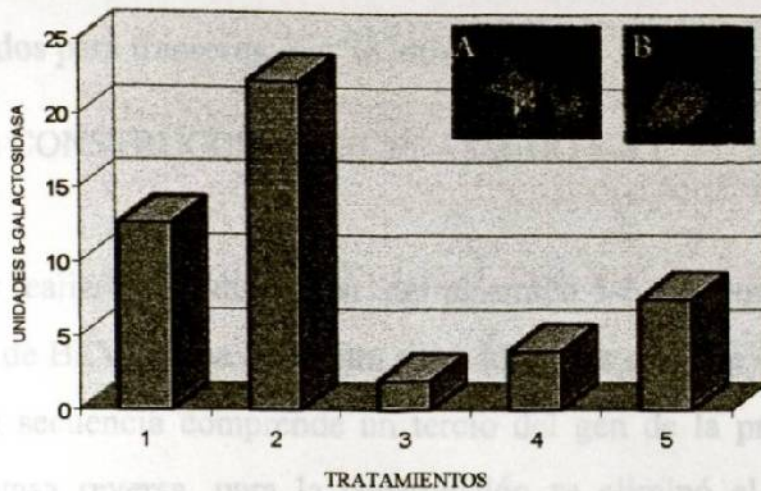


Figura. 11. Actividad de β -galactosidasa en los extractos de células FLK-BLV. 1) Fórmula A con anticuerpos 2) Fórmula B con anticuerpos 3) Fórmula A sin anticuerpos, 4) Fórmula B sin anticuerpos. 5) Transfección con fosfato de calcio.

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 .

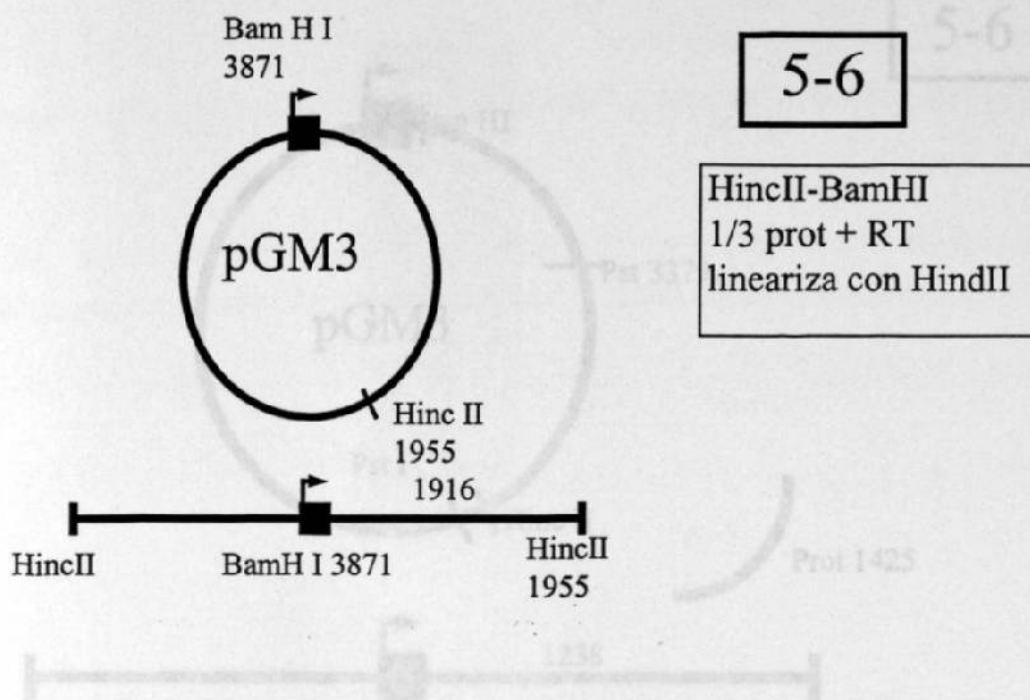


Figura 12. Mapa del Plásmido original 5-6.

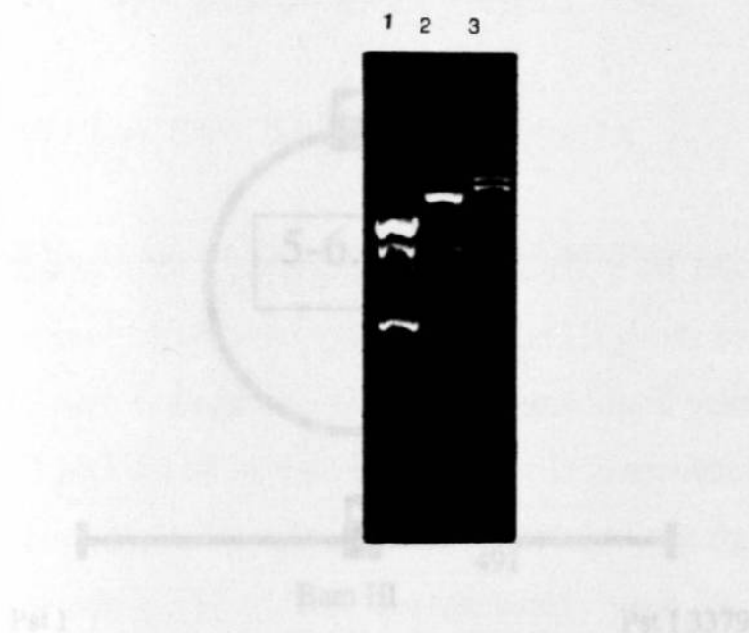
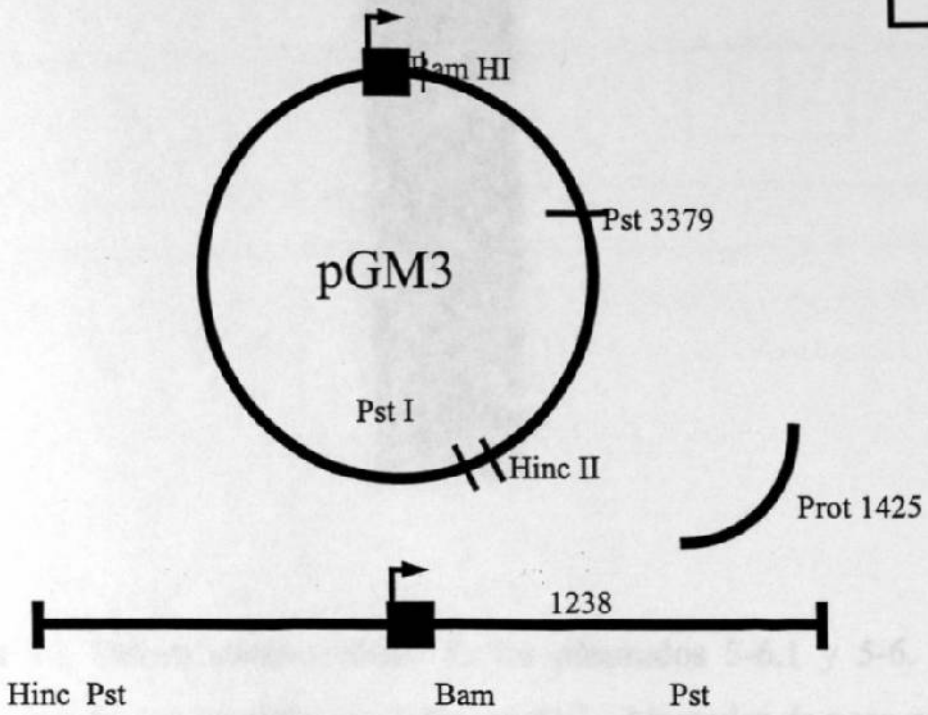


Figura 13. Liberación del fragmento PstI del plásmido 5-6. Gel de agarosa al 0.8% que muestra los patrones electroforéticos del plásmido 5-6. Carril 1.- digerido con BamHI-PstI, carril 2.- PstI

5-6

A



B

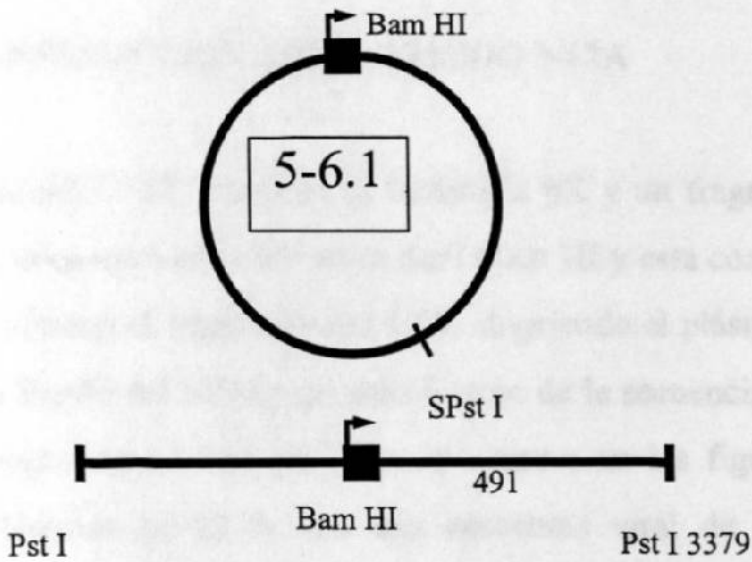


Figura 14 Construcción de plásmido 5-6.1