

**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 ladder) 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).

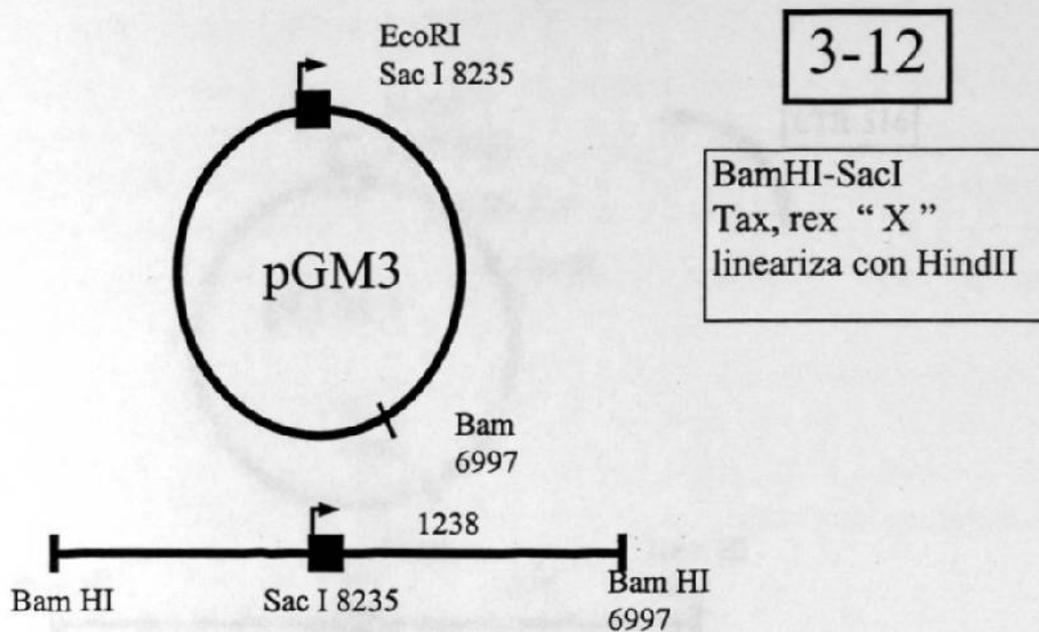
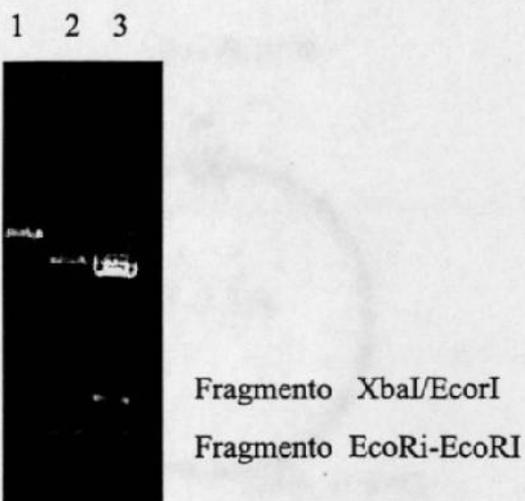


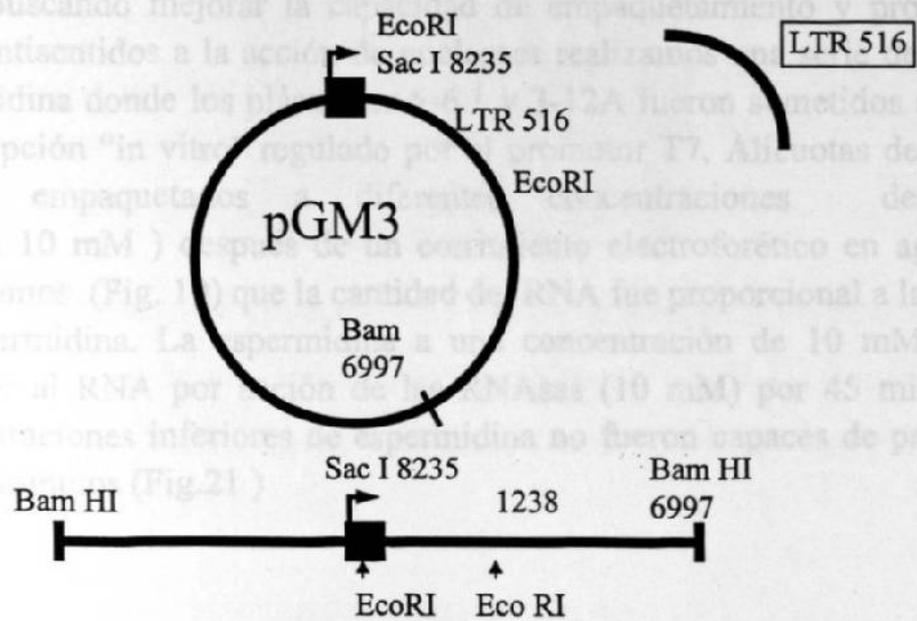
Figura 16 Mapa del Plásmido original 3-12



**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

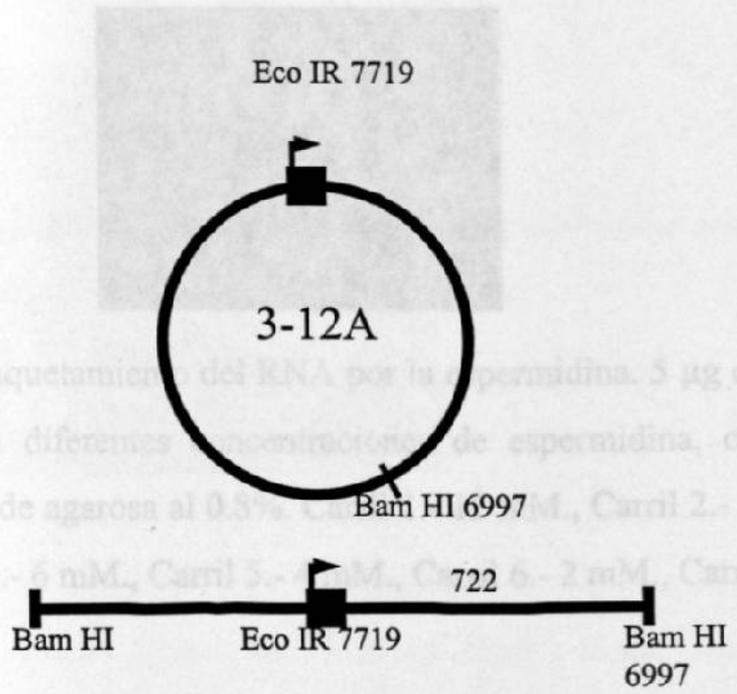
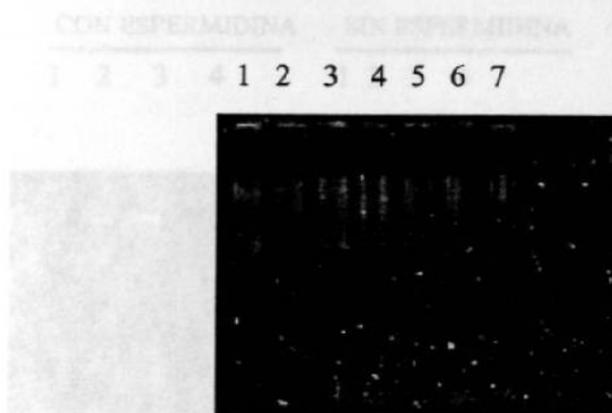


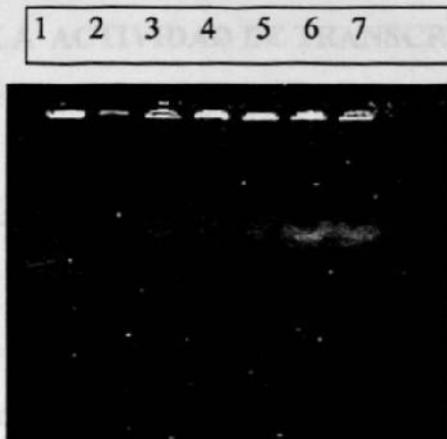
Figura 18. Construcción del plásmido 3-12 A

#### 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)

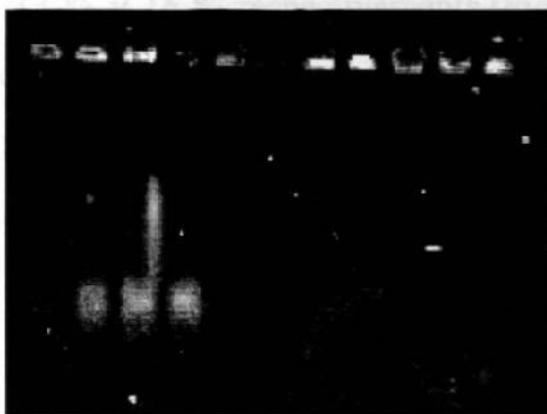


**Figura 19.** Empaquetamiento del RNA por la espermidina. 5  $\mu$ g de RNA fueron empaquetados con diferentes concentraciones de espermidina, centrifugados y corridos en un gel de agarosa al 0.8%. Carril 1.- 12 mM., Carril 2.- 10 mM., Carril 3.- 8 mM., Carril 4.- 6 mM., Carril 5.- 4 mM., Carril 6.-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

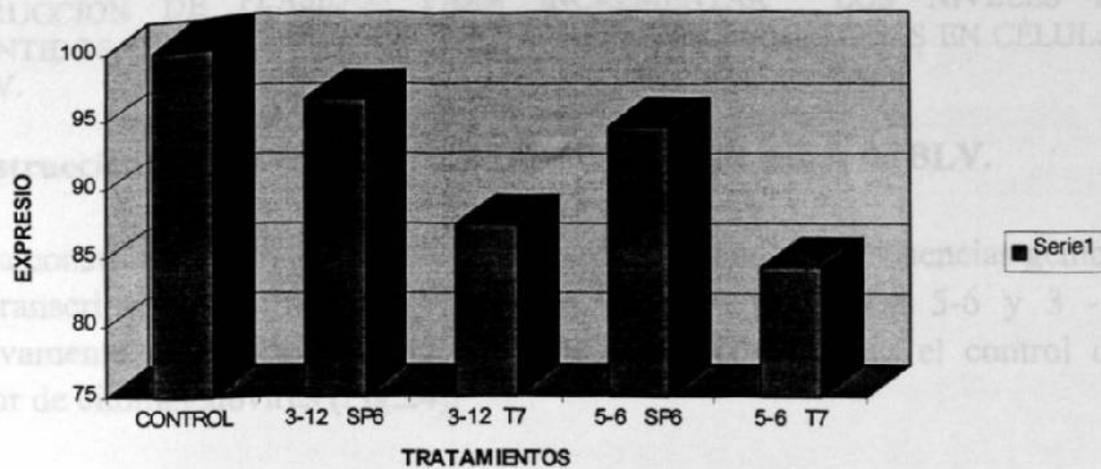
CON ESPERMIDINA				SIN ESPERMIDINA			
1	2	3	4	1	2	3	4



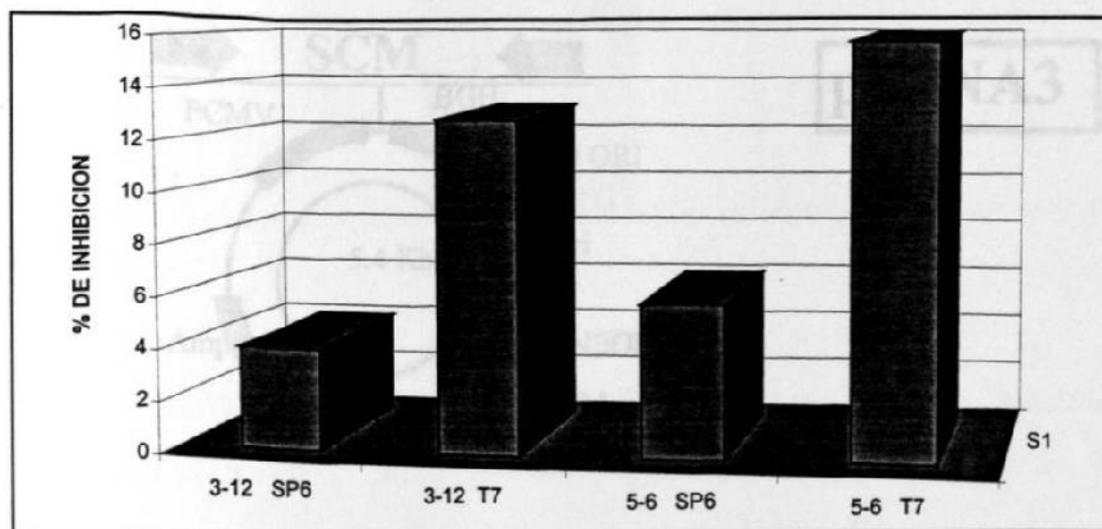
**Figura 21.** Protección del RNA con espermidina 10mM a la acción de RNAasa diferentes tiempos. Carril 1 ,15 min., carril 2, 30 min., carril 3, 45 min., carril 4, 60 mM.

## **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 antisentido para pol.

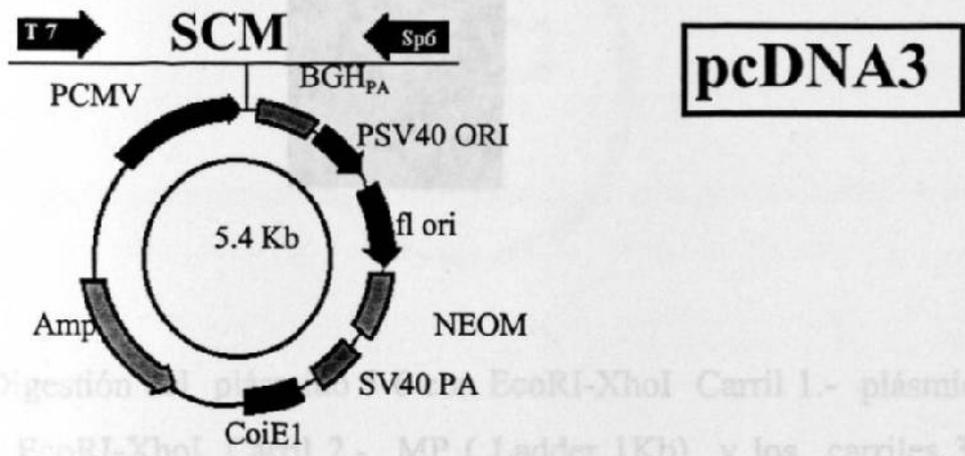


**Figura 23.** Inhibición de la expresión de la transcriptasa reversa y de proteínas vírales en células FLK-BLV tratadas con RNA sentido y antisentido.

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

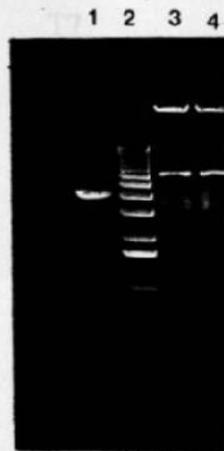
**B) Construcción de plásmidos para la transferencia de genes de BLV.**

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

CONSTRUCCION DE pVHP LA TRANSFERENCIA

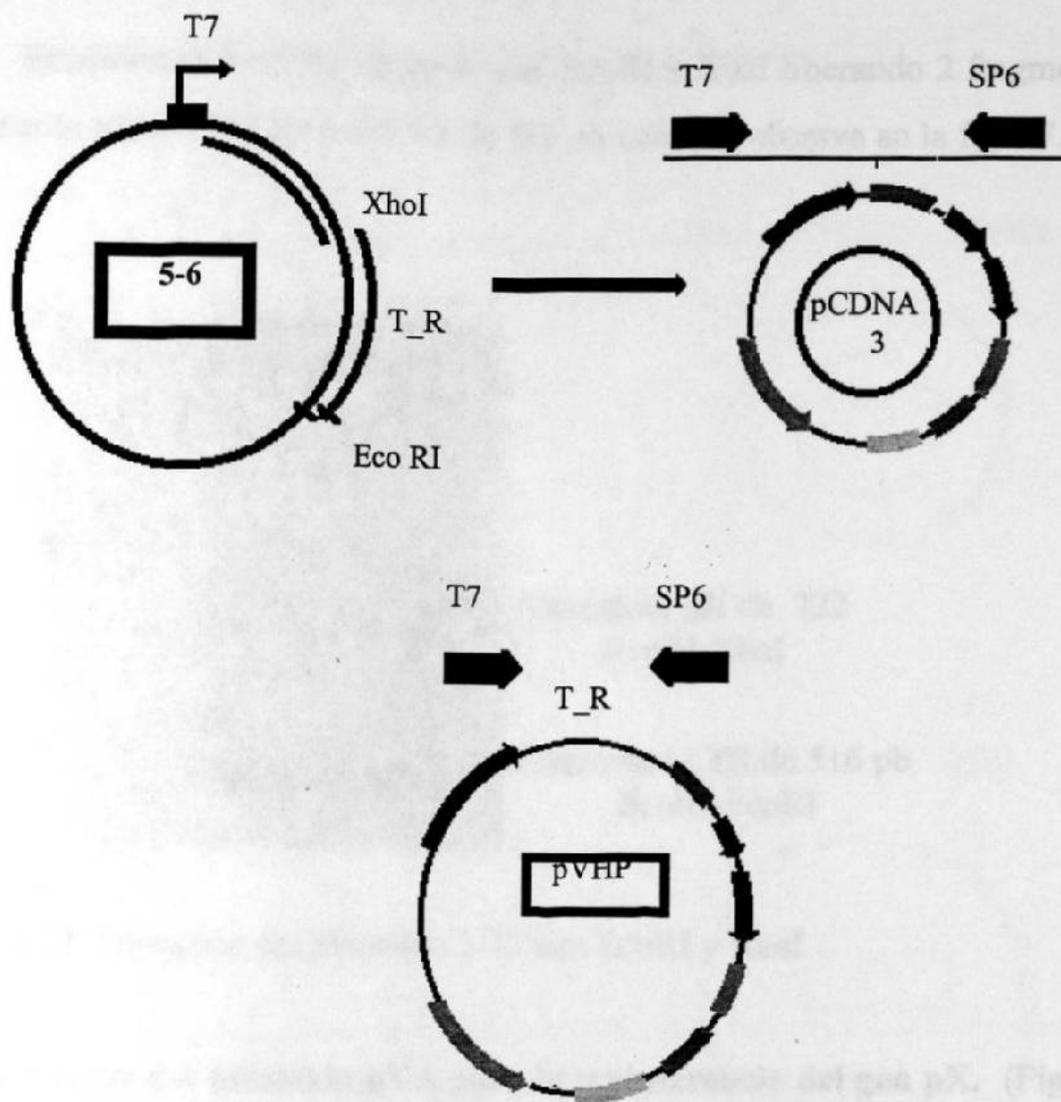
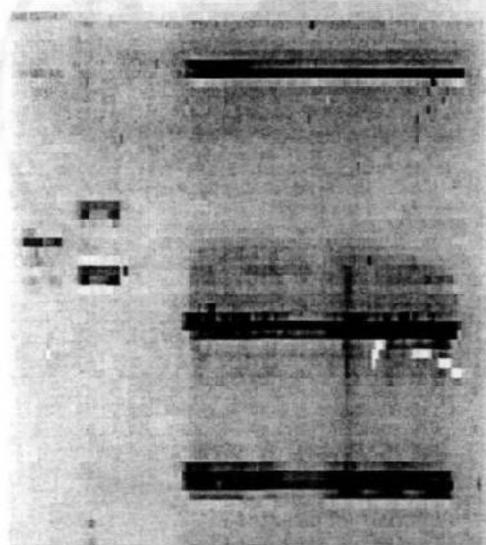


Figura 26 Diagrama de construcción del Plásmido pVHP

## 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.



Fragmento pX de 722  
EcoRI-XbaI

Fragmento LTR de 516 pb  
EcoRI-EcoRI

**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

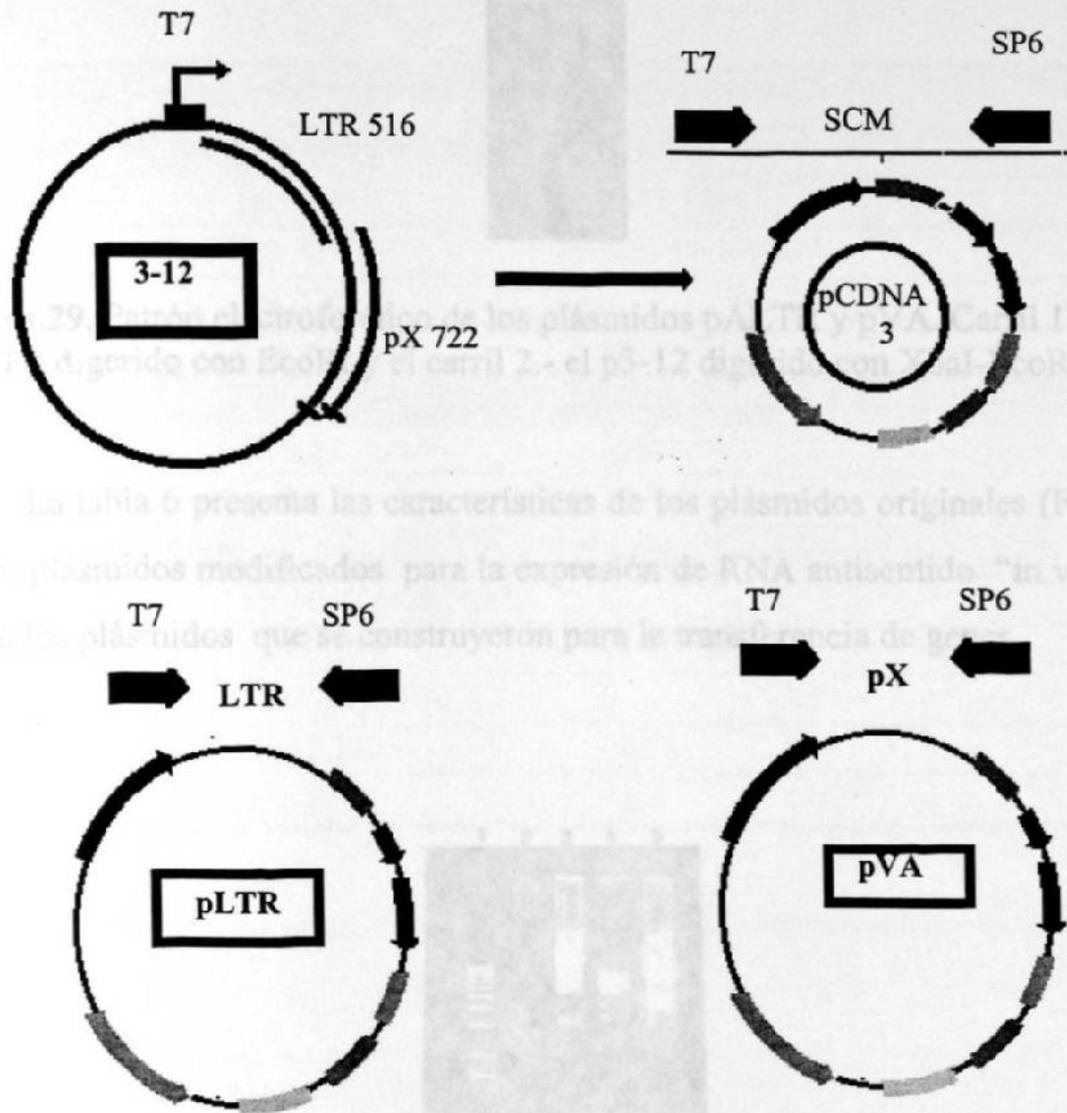


Figura 28. Diagrama de construcción de los Plásmidos pALTR y pVA

1 2



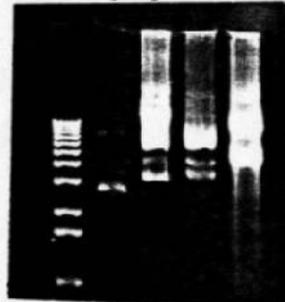
Tabla 4. Características de los plásmidos originales y modificados

No	Plásmido original	Plásmido modificado
1	p3-12	p3-12 + LTR
2	p5-6	p5-6 + Prot + Pol
	p3-12 A	p3-12 + pCDNA3
	pALTR	pALTR + LTR
	pVA	pVA + pX

**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.

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-β-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

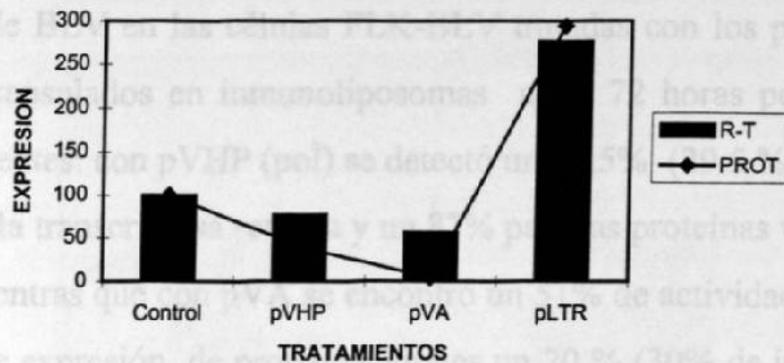
## **VIII.- INHIBICION DE LA EXPRESION DE BLV POR TRANSFERENCIA DE GENES ANTISENTIDOS**

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

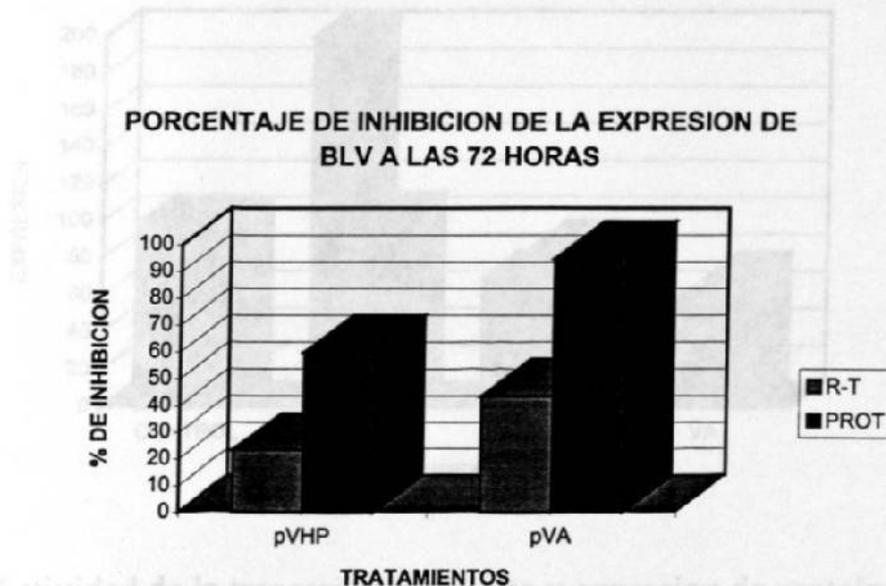
La expresión de BLV en las células FLK-BLV tratadas con los plásmidos VHP, VA y LTR fue medida por la actividad de transcriptasa reversa y por la expresión de proteínas virales. Los niveles de actividad de la transcriptasa reversa fueron medidos a las 72 h. Las células transfectadas con pVHP (pol) presentaron 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 las proteínas virales y la actividad de la transcriptasa reversa en las células FLK-BLV a las 72 horas post-transfección con los plásmidos VHP, VA y LTR encapsulados en inmunoliposomas fueron los siguientes: con pVHP (po) se detectó un 50% de inhibición de actividad de la transcriptasa reversa y un 13% de inhibición de expresión de proteínas virales (13% de inhibición) mientras que con pVA se detectó un 49% de inhibición 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



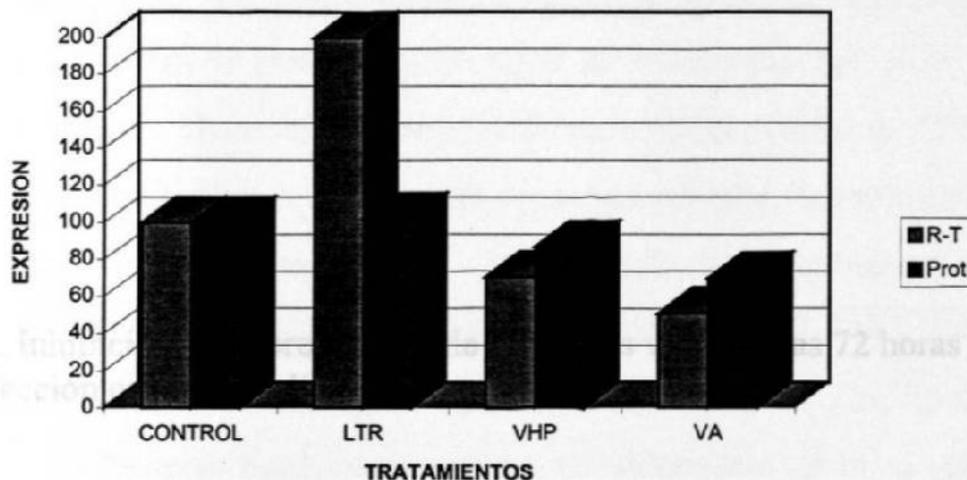
**Figura 31.** Actividad de la transcriptasa reversa y expresión de las proteínas virales en las células FLK-BLV a las 72 horas después de la transfección con fosfato de calcio.



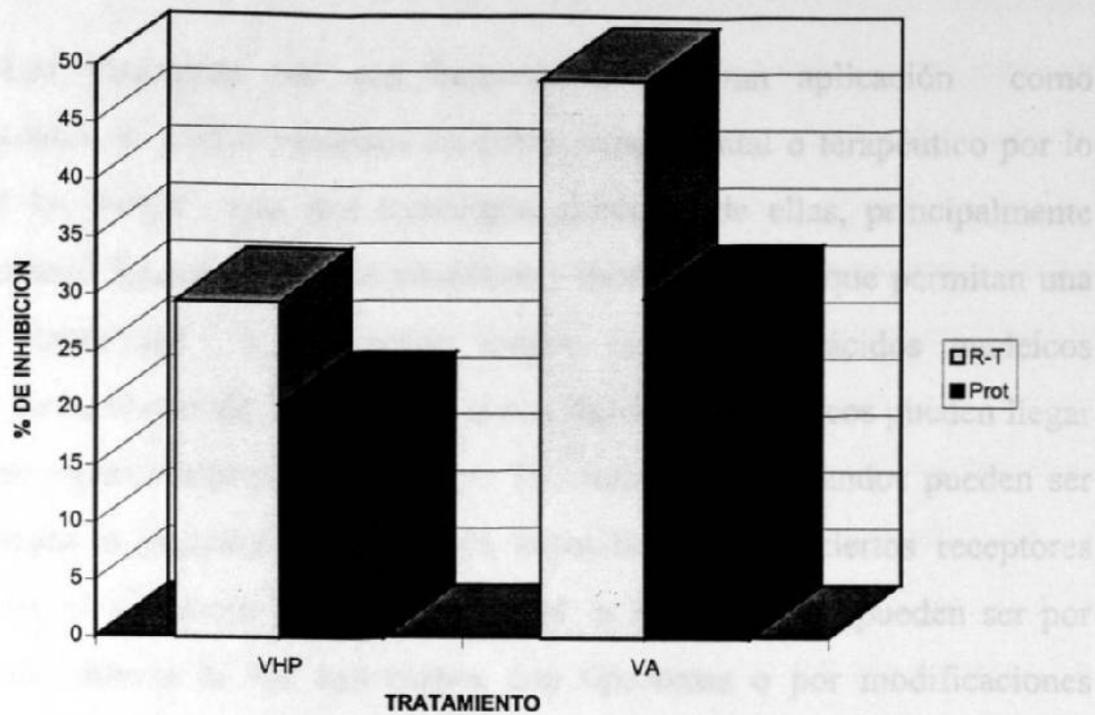
**Figura 32.** Inhibición de la producción de partículas virales a las 72 h. después de la transfección con fosfato de calcio.

## 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.



**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 construidos 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.

## 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 1 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. - BurrIDGE, 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. reseach, 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. Inhibition 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 I 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.Grummyt., 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 tha 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 volúmenes 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  $\mu$ 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 2 $\mu$ l 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.

**Solucion 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.

# **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°C o -70°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 VIIa 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..



