



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

**FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA**

**TESIS DE LICENCIATURA PARA OBTENER EL GRADO DE  
MÉDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA**

**“IDENTIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA G DEL VIRUS DE LA RABIA  
EXPRESADA EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE MAÍZ, Y SU  
EVALUACIÓN COMO INMUNÓGENO ORAL EN RATONES”**

**PRESENTA:  
LUIS GÓMEZ NÚÑEZ**

**ASESORA DE TESIS  
DRA. ELIZABETH LOZA RUBIO**

**MÉXICO D. F.**

**ENERO, 2007**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis padres José Antonio y Graciela por su ejemplo de vida y enseñarme que todo en la vida se puede lograr, con el simple hecho de creer diariamente en lo que uno hace.

A mis hermanos Jackeline y Pepe por todo el apoyo incondicional y su capacidad de comprensión y respeto otorgado hacia mi forma de pensar.

A mis abuelos Faustino y Josefina<sup>†</sup> porque cada día con sus enseñanzas y consejos me otorgan la oportunidad de ser una mejor persona para convivir con los demás y a Luis Ezequiel<sup>†</sup> y Antonia por creer en mi y demostrarme siempre que mis sueños son sus sueños.

A mis tíos Joel, Marcos, Lorena, Libia, Saúl, Luz, Alejandra, Alicia, Alberto, Leticia<sup>†</sup> y a todos mis primos por compartir su tiempo y espacio para apoyarme en mis decisiones aunque en ocasiones no hayan sido las más adecuadas.

A la Dra Elizabeth Loza Rubio por toda la paciencia que le ha otorgado a la realización de este trabajo, por su amistad en los momentos difíciles y por ayudarme a levantar cuando se han presentado adversidades.

A mis compañeros Edith, Octavio, Rosa, Nayeli, Rebeca, Karen, por hacer de las horas de trabajo, los momentos más especiales de mi vida en compañía de ustedes y por compartir todos sus conocimientos conmigo.

Para ti que sabes lo especial que eres para mí y que a su vez me apoyaste siempre cuando te necesitaba, siendo en ocasiones fuente de inspiración y superación, por todo esto y mucho más te doy las gracias.

## **AGRADECIMIENTOS ESPECIALES**

**Al Conacyt por el financiamiento otorgado a esta investigación a través del proyecto G34635B “Expresión de la proteína G del virus de la rabia en plantas transgénicas de maíz, y su evaluación como inmunógeno oral en bovinos”.**

**Al instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-CENID Microbiología Animal), por todo el apoyo brindado en la realización de esta tesis.**

## ÍNDICE.

Agradecimientos

Abreviaturas

I) Resumen .....	4
II) Introducción.....	7
2.1 Generalidades del virus de la rabia	
2. 1. 1) Clasificación del virus de la rabia.....	9
2. 1. 2) Proteínas virales.....	10
2. 1. 3) Mecanismos de transmisión.....	13
2. 1. 4) Replicación del virus.....	13
2. 1. 5) Patogenia del virus de la rabia.....	14
2. 1. 6) Histopatología del virus de la rabia.....	15
2. 1. 7) Síntomas de la enfermedad.....	16
2. 2) Situación de la rabia en América Latina.	
2. 2. 1) Rabia Humana.....	17
2. 2. 2) Rabia en Perros.....	18
2. 2. 3) Rabia en Bovinos.....	19
2. 2. 4) Situación epidemiológica de la rabia canina en México.....	19
2. 2. 5) Situación epidemiológica de la rabia parálitica en México.....	19
2. 3) Vacunas Antirrábicas.....	20
2. 3. 1) Respuesta inmune a la vacunación.....	23
2. 3. 2) Inmunidad de Mucosas.....	24
2. 3. 3) Reacciones Adversas a la Vacunación.....	24
2. 4) La utilización de plantas como biorreactores en la expresión de proteínas heterólogas para la producción de vacunas comestibles.....	27
2. 4. 1) Vacunas comestibles.....	28
2. 4. 2) El maíz como sistema de producción de vacunas comestibles.....	28
III) Hipótesis y Objetivos.....	30
3. 1) Hipótesis.....	31
3. 2) Objetivo General.....	31
3. 3) Objetivos Específicos.....	31
IV) Materiales y Métodos.....	33

4.1) Material biológico.....	33
4. 2) Identificación de la proteína G del virus de la rabia en semillas transgénicas de maíz.....	33
4. 3) Transferencia de las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa (Western blot).....	36
4. 4) Preparación de la pastilla de inmunización.....	38
4. 5) Inmunización de los animales por vía oral con la proteína G recombinante del virus de la rabia expresada en el maíz transgénico.....	38
4. 6) Análisis estadístico.....	39
4. 7) Anestesia de los animales para la toma de muestras sanguíneas.....	40
4. 8) Condiciones de alojamiento para los grupos experimentales.....	41
4. 9) Prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes para la determinación de anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia (RIFFT).....	41
V) Resultados.....	43
5. 1) Identificación de la proteína G del virus de la rabia en semillas transgénicas de maíz.....	43
5. 2) Cuantificación de la proteína G recombinante expresada en semillas transgénicas de maíz.....	43
5. 3) Transferencia de las proteínas separadas en el gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa (Western blot).....	45
5. 4) Prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes para la determinación de anticuerpos neutralizantes del virus de la rabia (RIFFT).....	48
5. 5) Eficacia de la Vacuna Comestible administrada en ratones.....	52
VI) Discusión.....	55
VII)Conclusiones.....	62
XIII)Referencias bibliográficas.....	66

## **ABREVIATURAS**

### **Ácidos Nucleicos**

**ARN**

**Ácido Ribonucleico**

**ADN**

**Acido Desoxiribonucleico**

**mRNA**

**Ácido Ribonucleico mensajero**

**RNP**

**Ribonucleoproteínico**

**NC**

**Nucleocápside**

### **Medidas de Longitud**

**cm**

**Centímetros**

**nm**

**Nanómetros**

**cm<sup>2</sup>**

**Centímetro cuadrado**

### **Medidas de Peso**

**mg**

**Miligramos**

**µg**

**Microgramos**

### **Medidas de Volumen**

**ml**

**Mililitro**

**µl**

**Microlitro**

### **Virus de la Rabia**

**EBL**

**Lyssavirus de Murciélago Europeo**

**CVS**

**Virus de Desafío Estándar**

**PV**

**Virus Pasteur**

## Otras Abreviaturas

<b>PAGE</b>	<b>Electroforesis en gel de poliacrilamida</b>
<b>SDS</b>	<b>Dodecil Sulfato de Sodio</b>
<b>PST</b>	<b>Proteína Soluble Total</b>
<b>BSA</b>	<b>Albúmina Sérica Bovina</b>
<b>PBS</b>	<b>Solución Salina Fosfatada</b>
<b>Xg</b>	<b>Fuerza de Gravedad</b>
<b>rpm</b>	<b>Revoluciones por minuto</b>
<b>CaMV</b>	<b>Promotor constitutivo del virus del mosaico de la coliflor</b>
<b>MARS</b>	<b>Región de Adherencia a la Membrana</b>
<b>V-RG</b>	<b>Vacuna de virus recombinante</b>
<b>RIFFT</b>	<b>Prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes</b>
<b>SR</b>	<b>Suero de referencia</b>
<b>SN</b>	<b>Suero Negativo</b>
<b>CC</b>	<b>Control de Células</b>
<b>[ ]</b>	<b>Virus de rabia concentrado</b>



# I. RESUMEN

## **RESUMEN.**

Identificación de la Proteína G del Virus de la Rabia en Plantas Transgénicas de Maíz, y su Evaluación como Inmunógeno Oral en Ratones. Tesista: Luis Gómez Núñez. Asesor: Dra. Elizabeth Loza Rubio.

La proteína G del virus de la rabia, ha mostrado tener propiedades inmunogénicas, siendo capaz de inducir una respuesta inmune en animales y conferir protección contra la infección del virus. Se identificó la proteína G realizando un Western blot de semillas de maíz transformadas con dos plásmidos PWR-21/pUBI y PGHCNS-MARS. Los cuales contenían al gen que codifica para la proteína G del virus de la rabia, bajo el promotor de ubiquitina y el terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor, en el primero; mientras que el segundo plásmido presentaba además una secuencia que codificaba para una región de adherencia a membrana (MARS). La cuantificación de la proteína G recombinante se realizó mediante una densitometría determinando la cantidad de proteína G recombinante por gramo de peso seco y el porcentaje de expresión de la proteína heteróloga en el sistema vegetal. Para la evaluación de la inmunidad humoral, se formaron 4 grupos de 10 ratones cepa CD-1, inmunizados con los siguientes tratamientos: Grupo 1.- 50 µg de la proteína G recombinante (MTG); 2.- 50 µg de la proteína G recombinante + 5 µg de adyuvante oral (MTG+TC); 3.- 300 µl de vacuna de virus activo recombinante por vía intramuscular (V-RG), y 4.- maíz no transformado (MNT) por vía oral. La detección de anticuerpos se realizó mediante la técnica rápida de inhibición de focos fluorescentes (RIFFT), a los días 15, 30, 45, 60, 75, 90 post-inmunización.

En los grupos inmunizados; excepto en el control negativo (MNT), se detectó la presencia de anticuerpos neutralizantes específicos contra el virus de la rabia, en concentraciones mayores de 0.5 UI, recomendado por la OMS. Para determinar la inmunidad protectora que confirió la vacuna comestible, los animales fueron desafiados al día 90 post-inmunización, utilizando entre 50–100 DL<sub>50%</sub> con una cepa de origen vampiro. Para el día 15 post–inmunización los animales que no presentaron signología de la enfermedad de rabia se consideraron protegidos. El grupo inmunizado con la vacuna oral (MTG) y la vacuna de virus activo recombinante (V-RG), presentaron una inmunidad protectora del 100%, mientras que el grupo inmunizado con el adyuvante (MTG+TC), murieron al igual que el grupo control negativo (MNT).

## **II. INTRODUCCIÓN**

## **2. Introducción**

En la actualidad la vacunación constituye una de las principales prioridades de muchos países para prevenir un sin número de enfermedades tanto en humanos como en animales. Gracias a la adecuada aplicación de vacunas, existen enfermedades cuya incidencia ha disminuido de manera notable en países en vías de desarrollo. En general las vacunas comestibles proveen un promisorio ejemplo de nuevas estrategias que combinan la innovación en la ciencia médica y la biología en plantas para la creación y disposición de nuevos productos farmacéuticos. En el campo de la zoonosis, la proteína G y la proteína N del virus de la rabia, han sido expresadas en diversos vegetales y se han realizado varios ensayos de inmunización tanto en humanos como en ratones; sin embargo apenas se inician pruebas para producir una vacuna comestible contra la rabia bovina, padecimiento que en América Latina causa severas pérdidas económicas. En el presente estudio se evaluó a la proteína G del virus de la rabia expresada en plantas transgénicas de maíz como inmunógeno oral en ratones. Considerando la inducción de anticuerpos neutralizantes específicos para el virus de la rabia, y el nivel de protección reflejado en el porcentaje de sobrevivencia post-desafío. En base a los resultados obtenidos se confirmó que el empleo de plantas transgénicas es un sistema seguro para la producción de vacunas, que a futuro podría convertirse en una alternativa atractiva para el desarrollo de nuevas vacunas en nuestro país y otros países con problemas similares.

## 2.1 Generalidades de la Rabia

La rabia es una infección aguda del sistema nervioso central casi siempre mortal, se identifica como una enfermedad letal en especies de sangre caliente, incluyendo al género humano, radicando su importancia, en la alta letalidad presentada en los enfermos. Pasteur a finales del siglo XIX ensaya la primera vacunación antirrábica en José Meister<sup>1</sup>. La vacunación constituye hasta nuestros días el único tratamiento para la prevención post-exposición. En la década de los 90's descendieron los casos de rabia en humanos transmitida por perros; sin embargo, las agresiones ocasionadas por especies silvestres se han incrementado en países en vías de desarrollo.<sup>2</sup>

La rabia en los murciélagos hematófagos o vampiros es un problema limitado a América Latina, Trinidad y Tobago, la infección ha sido comprobada en las tres especies de hematófagos: *Desmodus rotundus*, *Diphylla ecaudata* y *Diaemus youngi*, pero solamente la primera especie posee importancia epidemiológica. La distribución de los murciélagos hematófagos *Desmodus rotundus* comprende un área que se extiende desde México hasta la parte central de Argentina. El *Desmodus rotundus* es responsable de pérdidas en la ganadería latinoamericana por la rabia bovina, que ha impedido el desarrollo de nuevas regiones del Trópico Americano. Se ha estimado que la mortalidad anual producida por esta especie en Latinoamérica es cercana a las 50,000 cabezas de ganado, lo que sumado a pérdidas indirectas de carne, leche y la devaluación de pieles por mordeduras de vampiros, significa una pérdida anual superior a los US \$ 44 millones.<sup>3</sup>

### 2.1.1 Clasificación del Virus de la Rabia

El virus de la rabia pertenece al orden de los Mononegavirales, familia ***Rhabdoviridae***, género Lyssavirus. Su genoma RNA conformado por 11,932 nucleótidos, es no segmentado, unicadena y de polaridad negativa. Su morfología es cilíndrica y presenta una forma característica de bala de fusil, la longitud promedio es de 180 nm y su diámetro de 75 nm. El género Lyssavirus, se ha clasificado por el análisis de las secuencias del genoma viral permitiendo definir 7 genotipos<sup>4</sup>. El genotipo 1 comprende al virus de la rabia clásica, que se encuentra distribuido a nivel mundial, excepto en algunas islas como Japón, Nueva Zelanda, Hawai, Irlanda, Reino Unido, Antártida y Escandinavia. El genotipo 2 corresponde al virus Lagos bat, 3 al virus Mokola, 4 al virus Duvenhage que están presentes en el continente africano, en países como Nigeria, República Centroafricana, África del Sur, Zimbabwe, Guinea, Senegal, Etiopía y Camerún. El genotipo 5 y 6 representan a los Lyssavirus de murciélagos europeos tipo EBL 1 y EBL 2.<sup>5, 6</sup> El virus aislado en Australia, proveniente de un murciélago frugívoro (*Pteropus alecto*) conocido como zorra voladora fue clasificado como genotipo 7<sup>7, 8</sup>.

Cuatro nuevos Lyssavirus fueron descubiertos a través de una vigilancia activa de rabia en murciélagos de Eurasia. El virus de Aravan (ARAV), fue aislado del cerebro de un murciélago (*Myotis blythi*) al sur de Kirgizstan en 1991<sup>9</sup>. El virus Khujand (KHUV), se aisló en el 2001 cerca de la ciudad de Khujand, al norte de Tajikistan, del cerebro de un murciélago (*Myotis mystacinus*)<sup>10</sup>. En el 2002, se aisló al tercer virus llamado Irkut (IRKV) al norte de Liberia en la ciudad de Iskutsch de un murciélago (*Murina leucogaster*).

Por último se aisló al virus Caucásico del Oeste (WCBV) de un murciélago (*Miniopterus schreibersi*) capturado cerca de una cueva en las montañas caucásicas<sup>11</sup>. Inocularon por vía intracerebral una mezcla de los cuatro cerebros de los murciélagos en ratones, los cuales comenzaron a paralizarse y murieron. Las impresiones de los cerebros de ratón resultaron positivas a la prueba directa de anticuerpos fluorescentes contra el virus de la rabia<sup>10, 11</sup>. La caracterización de estos aislados reveló que eran distintos antigénica y genéticamente, de los Lyssavirus conocidos<sup>12</sup>.

El virión está compuesto por 5 genes: *n*, *ns*, *m*, *g*, *l*, que codifican para el mismo número de proteínas. Los genes están separados por secuencias cortas que representan las regiones intergénicas del genoma. Estas regiones están localizadas entre los genes *n* y *ns* (2 nucleótidos) y entre los genes *ns* y *m* (5 nucleótidos en cada uno). La región restante entre los genes *g* y *l* contiene 423 nucleótidos de longitud y no codifica para ninguna proteína<sup>17</sup> (Figura 1).

### **2.1.2 Proteínas Virales**

La proteína *N*, conformada por 450 aminoácidos, tiene un peso molecular de 57,000 Da. Es el principal componente del virus de la rabia, esta asociada con el RNA viral protegiéndolo de ribonucleasas y manteniéndolo en una configuración adecuada para la transcripción, activa la polimerasa viral para que se pueda llevar a cabo la replicación. Su interés inmunológico radica, en que induce la respuesta de células T cooperadoras otorgando protección al desafío contra la rabia<sup>18</sup>.



La fosfoproteína (*P*, *M1* ó *NS*), conformada por 297 aminoácidos, esta asociada con la ribonucleoproteína (RNP) e interactúa con la polimerasa regulando la replicación del genoma viral. Sirve como un estabilizador de la proteína *L* colocándola en el complejo de la polimerasa<sup>19</sup>.

La proteína *L* (RNA polimerasa asociada al virión), conformada por 2,142 aminoácidos, es responsable de la transcripción y replicación del RNA viral. Las proteínas *N*, *NS*, *L* asociadas al RNA viral constituyen la nucleocápside o centro RNP<sup>20</sup>.

La proteína *M* esta conformada por 202 aminoácidos. Sus propiedades funcionales incluyen sub-regulación de la transcripción del RNA viral, condensación del centro NC helicoidal a espirales plegadas fuertemente, asociación con la bicapa lipídica e involucramiento en la citopogénesis de células infectadas<sup>21</sup>.

La proteína *G* conformada de 505 aminoácidos, tiene un peso molecular de 65,000 Da, se encuentra localizada en la envoltura viral, es transmembranal y forma en la superficie del virus espículas homotriméricas ancladas a la membrana<sup>22, 23</sup>. Es importante en la patogenicidad y el neurotropismo del virus *in vivo*, siendo responsable de la inducción de anticuerpos neutralizantes y la estimulación de linfocitos T cooperadores y citotóxicos. Esta involucrada en el reconocimiento del receptor celular específico y a pH bajo induce la fusión de la envoltura viral con la membrana celular<sup>24, 25</sup>.



### **2.1.3 Mecanismo de Transmisión**

El mecanismo de transmisión del virus rábico es a través de la mordedura de un animal infectado, que libera el virus por la saliva a uno susceptible. El virus es mantenido y transmitido por varias especies dependiendo de la zona geográfica, en los países de Europa Occidental los zorros rojos<sup>29</sup>, en América del Norte los mapaches, zorrillos y los murciélagos no hematófagos<sup>30, 31</sup>. En América Latina los principales reservorios son los perros y a últimas fechas los murciélagos hematófagos (vampiros)<sup>32, 33</sup>, y los no hematófagos<sup>34, 35</sup>. En México se conocen tres ciclos epidemiológicos: el terrestre representado por los perros<sup>13</sup>, y el silvestre por los murciélagos hematófagos<sup>14</sup> y un ciclo que circula en zorrillos, sin embargo; las vacunas disponibles en el país son capaces de proteger adecuadamente ante un desafío contra cualquiera de las tres variantes genéticas<sup>15, 16</sup>.

### **2.1.4 Replicación del Virus.**

El virus de la rabia se une a las células por medio de sus espigas de glicoproteína; el receptor nicotínico de la acetilcolina sirve como receptor celular para el virus de la rabia. El genoma de RNA de una sola cadena es transcrito por la RNA polimerasa vinculada con el virión a cinco especies de mRNA. La plantilla para la transcripción es el genoma de RNA en forma de ribonucleoproteína (RNP) (encerrado en la proteína N y el cual contiene la transcriptasa viral). El mRNA policistrónico codifica las cinco proteínas del virión: nucleocápside (*N*), polimerasa (*L*, *NS*), matriz (*M*) y glucoproteína (*G*). El genoma RNP es una plantilla para el RNA complementario de sentido positivo que se encarga de la generación de la progenie de RNA de sentido negativo<sup>36</sup>.

Las mismas proteínas virales sirven como polimerasa para la replicación del RNA viral y también para la transcripción. Se requiere la traducción simultánea para la replicación, particularmente de las proteínas virales *N* y *P*. El RNA genómico recién formado se une a la transcriptasa viral y a la nucleoproteína para formar el centro RNP en el citoplasma. Las partículas adquieren una envoltura por gemación a través de la membrana plasmática. La proteína viral matriz forma una capa sobre la zona interna de la envoltura, en tanto que la glicoproteína viral se encuentra sobre la capa externa y forma las espigas<sup>37</sup>.

### **2.1.5 Patogenia**

El virus se distribuye ampliamente dentro del animal infectado, sobre todo en el sistema nervioso, saliva, orina, linfa, leche y sangre. La recuperación de la infección es rara excepto en ciertos murciélagos, en los cuales el virus muestra una adaptación peculiar en las glándulas salivales. Los murciélagos hematófagos pueden transmitir el virus durante meses sin que ellos mismos muestren signos de enfermedad<sup>38</sup>. El virus de la rabia se replica en el músculo; en el sitio de la inoculación y después penetra a los nervios periféricos en las uniones neuromusculares y se propaga por los nervios al sistema nervioso central. Es posible que algunos virus de la rabia penetren directamente al sistema nervioso sin replicación local. Se replica en el cerebro y después puede diseminarse a través de los nervios periféricos hacia las glándulas salivales y otros tejidos. El órgano con los mayores títulos de virus es la glándula salival submaxilar. Otros órganos donde se encuentra el virus de la rabia incluyen páncreas, riñón, corazón, retina y córnea<sup>39</sup>

La susceptibilidad a la infección y el periodo de incubación de la rabia es de lo más variable, dependen de la edad del huésped, de los antecedentes genéticos y del estado de inmunidad, de la cepa viral implicada, de la cantidad del inóculo, de la gravedad de las heridas, y de la distancia que el virus debe viajar desde su sitio de entrada hasta el sistema nervioso central<sup>36</sup>.

### **2.1.6 Histopatología de la Rabia**

En el estudio histopatológico de la rabia se observan lesiones típicas de una encefalomiелitis no supurativa, común en todas las infecciones virales del sistema nervioso, es decir la reacción inflamatoria esta constituida por una infiltración perivascular de linfocitos, gliosis focal o difusa (nódulos de Babes), hemorragia perivascular y diversos grados de degeneración neuronal, y los característicos corpúsculos de Negri. Estas inclusiones se consideran patognomónicas de la rabia y se localizan principalmente en las neuronas, axones y dendritas del hipocampo; células piramidales de la corteza cerebral; en las células de Purkinje del cerebelo y ganglio de Glasser. Los cuerpos de Negri generalmente son redondos, pero pueden adoptar formas ovals, esferoideas, ameboides, alargadas, etc. La característica más importante de los cuerpos de Negri es su estructura interna en la que se basa el criterio indispensable para una identificación segura, dentro de la matriz acidófila aparecen gránulos basófilos, de color azul oscuro a negro, en número y distribución variable<sup>40</sup>.

### **2.1.7 Aspectos clínicos**

En humanos la enfermedad se divide en cinco fases: periodo de incubación, fase prodrómica, fase neurológica, coma y muerte. El periodo de incubación de la rabia es de lo más variable de uno a dos meses pero puede ser tan breve como una semana o tan prolongado como varios años (seis años o más). El periodo prodrómico dura de 2 a 10 días y puede mostrar cualquiera de los siguientes síntomas inespecíficos: malestar, anorexia, cefalea, fotofobia, náusea, vómito y malestar faríngeo<sup>41</sup>. Durante la fase neurológica aguda los pacientes muestran signos de disfunción del sistema nervioso, aprensión y alucinaciones. Se observa sobreactividad simpática general, la cual incluye lagrimeo, dilatación pupilar, e incrementos de la salivación y sudación. El acto de la deglución desencadena un espasmo doloroso de los músculos faríngeos. Esta fase va seguida de convulsiones, coma y muerte, en general 2 a 7 días después del inicio, la principal causa de muerte es la parálisis respiratoria<sup>36</sup>.

En el ganado se presenta tres fases: prodromal, de excitación y paralítica. La manifestación inicial es la pérdida de apetito y secreción de leche en vacas lecheras, inquietud, miedo y un cambio en la conducta (temperamento). Seguida en uno o dos días por inquietud, excitación, salivación, vocalización atípica, pateando el piso, etc. El animal rabioso se vuelve tranquilo e inestable como resultado de la parálisis progresiva. Se observa dificultad en tragar, acompañada por salivación excesiva. La emaciación ocurre rápidamente y las patas posteriores se paralizan. El animal progresa a no poder levantarse, desarrolla convulsiones, coma y muere de 4-6 días luego de observados los primeros síntomas clínicos<sup>42</sup>.

La rabia en los perros se caracteriza por cambios en el comportamiento asociados con el sistema nervioso central. El curso clínico de la enfermedad se describe en tres fases: La fase prodrómica es un periodo corto, cerca de tres días, en la cual se detectan anomalías en el sistema nervioso central. Los animales pueden aparentar estar anoréxicos. La fase de excitación ocurre después, no todos los animales experimentan esta fase, los perros pueden tornarse agresivos, extremadamente alertas, con pupilas dilatadas. Pueden romperse los dientes al morder las barras de su jaula, pueden atacar a otros animales o a sus dueños. Pueden agredir objetos inanimados. La fase paralítica es la última etapa de la rabia, se evidencia la parálisis de los músculos asociados con tragar y masticar. Se puede observar salivación profusa, perdiendo el animal la capacidad de tragar. En perros se ve frecuentemente la parálisis de la mandíbula al igual que el prolapso del tercer párpado. La parálisis progresiva desenlaza en la muerte<sup>43</sup>.

## **2.2 Situación de la Rabia en Países de América Latina**

### **2.2.1 Rabia Humana**

Durante el periodo 1993-2002, los países de América Latina notificaron un descenso del 82% en el número de casos humanos. Reduciendo de 216 casos en 1993 a 39 en el año de 2002. De los 39 casos reportados en este año, en 37 de ellos se contaba con información de la especie agresora, reconociendo a los perros como transmisor de 22 casos distribuidos en 5 países: Brasil (6 casos); Haití (5); El Salvador (5); Paraguay (4); y Bolivia (2)<sup>44</sup>

La rabia en los perros se caracteriza por cambios en el comportamiento asociados con el sistema nervioso central. El curso clínico de la enfermedad se describe en tres fases: La fase prodrómica es un periodo corto, cerca de tres días, en la cual se detectan anomalías en el sistema nervioso central. Los animales pueden aparentar estar anoréxicos. La fase de excitación ocurre después, no todos los animales experimentan esta fase, los perros pueden tornarse agresivos, extremadamente alertas, con pupilas dilatadas. Pueden romperse los dientes al morder las barras de su jaula, pueden atacar a otros animales o a sus dueños. Pueden agredir objetos inanimados. La fase paralítica es la última etapa de la rabia, se evidencia la parálisis de los músculos asociados con tragar y masticar. Se puede observar salivación profusa, perdiendo el animal la capacidad de tragar. En perros se ve frecuentemente la parálisis de la mandíbula al igual que el prolapso del tercer párpado. La parálisis progresiva desenlaza en la muerte<sup>43</sup>.

## **2.2 Situación de la Rabia en Países de América Latina**

### **2.2.1 Rabia Humana**

Durante el periodo 1993-2002, los países de América Latina notificaron un descenso del 82% en el número de casos humanos. Reduciendo de 216 casos en 1993 a 39 en el año de 2002. De los 39 casos reportados en este año, en 37 de ellos se contaba con información de la especie agresora, reconociendo a los perros como transmisor de 22 casos distribuidos en 5 países: Brasil (6 casos); Haití (5); El Salvador (5); Paraguay (4); y Bolivia (2)<sup>44</sup>



Murciélagos de diferentes especies son considerados el segundo transmisor de la rabia al humano, aproximadamente el 14.7% de los casos estudiados durante los últimos 10 años. En América Latina, en el periodo de 1993-2002, 62 casos de rabia en humano fue transmitida por el murciélago hematófago *Desmodus rotundus*. La mayoría de los casos (45), se reportaron en Perú, 8 de ellos en 1996. Los otros fueron en: Brasil (6); México (4); Colombia (3); Panamá (2); El Salvador (1) y Nicaragua (1). En este mismo periodo, se reportaron 27 casos de rabia, teniendo como transmisores a varias especies de murciélagos no hematófagos. Diecinueve de estos casos ocurrieron en los Estados Unidos. En los últimos 20 años se redujo el 90% de los casos de rabia en el Continente Americano, teniendo en el año 2005, 20 casos de rabia humana en Haití, Bolivia, Paraguay, El Salvador, México; etc. Atendiendo a 1 millón de personas agredidas por animales recibiendo 25% de ellas tratamiento<sup>45</sup>.

### **2.2.2 Rabia Canina.**

Durante el periodo 1993-2002, 37,377 casos de rabia en perros fueron reportados. En la región de América Latina, la rabia canina disminuyo un 81% durante este periodo (de 6,716 casos en 1993 a 1,311 casos en el 2002). En el 2005 se redujo la presentación de casos de rabia canina en 17 países de la región entre los principales se encuentran: Brasil (457), Bolivia (108), México (105). Además se administraron 44 millones de vacunas anualmente, y se procesaron 74,000 muestras de caninos para diagnóstico de rabia. Cabe señalar que América Latina es el único continente que presenta un programa global para el control y erradicación de enfermedades, entre las cuales se incluye la rabia<sup>46</sup>.

### **2.2.3 Rabia Bovina**

Diariamente en Latinoamérica son mordidos por murciélagos hematófagos *Desmodus rotundus* del 1 al 3% de la población de bovinos en un área de 5 millones de cabezas. Al aumentar la población de bovinos en una zona geográfica, se incrementa de igual forma la población de murciélagos hematófagos<sup>47</sup>. Como resultado del uso irracional de los recursos naturales llevado a cabo por el hombre, afectando el hábitat natural de diversas especies silvestres, entre las cuales se encuentran los murciélagos insectívoros, nectívoros y hematófagos, presentándose un desequilibrio en la biodiversidad y con ello la presencia de la rabia en el lugar<sup>48</sup>.

### **2.2.4 Situación Epidemiológica de la Rabia Canina en México**

Antes de Octubre del 2005 se habían diagnosticado en laboratorio 85 casos de rabia canina en México, 73 de los casos mencionados se encontraron en el Estado de México, presentándose un brote de 53 casos en el municipio de Ecatepec de Morelos (Sierra de Guadalupe), los cuales procedían de perros que no habían sido vacunados y cuyas edades oscilaban entre 0-8 años de edad. Los Estados que actualmente se encuentran afectados por rabia canina son 14, existiendo 17 entidades certificadas como libres de rabia canina hasta el 2004<sup>49</sup>.

### **2.2.5 Situación Epidemiológica de la Rabia Paralítica en México.**

La rabia paralítica bovina o derriengue actualmente se presenta en 23 Entidades Federativas. Hasta el mes de Octubre del 2005 se notificaron 139 casos positivos diagnosticados por inmunofluorescencia y 1 caso por medio de histopatología<sup>50</sup>.

En el Estado de San Luis Potosí se reporta el 60% de los focos de rabia parálitica bovina. La distribución de los brotes de derriengue coincide con el hábitat de las poblaciones del murciélago hematófago *Desmodus rotundus*. Esta especie se alimenta principalmente de sangre del ganado bovino, equino o porcino, mordiendo a sus víctimas en las regiones de los hombros, espalda, base de los cuernos, orejas, patas, pezuñas y región anal, el efecto anticoagulante presente en la saliva de los murciélagos, permite el flujo de la sangre a través del canal del labio inferior<sup>51</sup>.

En la actualidad el *Desmodus rotundus*, ha podido modificar su capacidad de adaptación a zonas geográficas mayores a 2,000 metros sobre nivel del mar (msnm), aumentando el territorio de exposición en México y siendo responsable de grandes pérdidas en la ganadería. Se estima que anualmente mueren entre 15 a 20 mil bovinos, con una población de bovinos en riesgo superior a los 10 millones de cabezas de ganado<sup>52</sup>.

La incidencia de la rabia transmitida por estos mamíferos se incrementa conforme se acrecienta la ganadería en el país. Aunque se han realizado numerosos esfuerzos para controlar la enfermedad en los animales domésticos, muchas de las medidas manejadas para el control han sido inadecuadas, lo que ha llevado a pérdidas económicas y la disminución de poblaciones de quirópteros benéficos para los ecosistemas, sin necesariamente controlar el ciclo silvestre de la enfermedad<sup>53</sup>.

### 2.3 Vacunas Antirrábicas

A partir de la primera vacuna antirrábica desarrollada por Luis Pasteur en 1885<sup>1</sup>, que consistía en inoculaciones subcutáneas de una suspensión desecada de médula espinal de conejos rabiosos, se han desarrollado diferentes generaciones de vacunas. Las vacunas de primera generación se producen en tejido nervioso de diferentes animales inoculados con el virus de la rabia e inactivadas con fenol, formol, luz ultravioleta, y  $\beta$ -propiolactona<sup>54</sup>. A pesar de los graves efectos que pueden producir las vacunas de este tipo a partir de cerebro de cabra y borrego (tipo Semple) y en cerebro de ratón lactante (tipo Fuenzalida) se siguen utilizando en muchos países en vías de desarrollo ya que son fáciles de preparar<sup>55</sup>. En los 50's las vacunas de embrión de pato y la Flury de alto pasaje ingresaron al mercado y permanecieron hasta los años 80, siendo retiradas del mercado porque a menudo causaban reacciones adversas. En el año 1967 marca una fecha importante cuando una nueva generación de vacunas elaboradas en cultivo celular comenzó a ser utilizadas en humanos, siendo las más comunes las producidas en células diploides y células VERO<sup>56</sup>.

En el campo veterinario de países desarrollados, donde la rabia silvestre es la que prevalece se emplea con éxito la vacunación oral<sup>57</sup>, con las vacunas Raboral<sup>MR</sup> V-RG (virus recombinante de la vaccinia que expresa la proteína G)<sup>58</sup>, y con Rabigen<sup>MR</sup> SAG-2 (cepa doble mutante avirulenta cepa SAG2)<sup>59</sup>. Esta estrategia ha conducido a la casi total erradicación de la rabia silvestre en Europa Occidental<sup>62</sup>, y tiene éxito en el control de la misma en Canadá, Estados Unidos, así como en otros países<sup>60, 61</sup>.

Más recientemente se ha notificado el diseño y evaluación de vacunas génicas en ratones<sup>62</sup>, primates<sup>63</sup> y perros<sup>64</sup>, obteniendo buenos resultados en la inducción de anticuerpos neutralizantes y el nivel de protección post-desafío.

En México las vacunas disponibles de interés veterinario se puede dividir en dos grupos: a) inactivadas y b) de virus activo modificado. Las ventajas de las vacunas derivadas de cultivos celulares sobre las derivadas de tejidos nerviosos, incluyen mayor pureza, adecuada estabilidad a temperatura ambiente, carencia de proteínas encefalitogénicas, disminución de proteínas extrañas reduciendo la probabilidad de anafilaxia y un incremento en su potencial para ser empleadas con adyuvantes<sup>65, 66, 67</sup>. A pesar de que por lo general las vacunas que se producen en el país presentan buena calidad al salir de los diferentes laboratorios, la conservación de biológicos tradicionales, especialmente en países en vías de desarrollo en ocasiones impide la aplicación adecuada de campañas preventivas, ya que se requiere de un complejo mecanismo de distribución acompañado de sistemas de refrigeración (cadena fría), cuestiones no siempre fáciles de llevar a cabo en los diferentes territorios que componen el país.

La biología molecular y la ingeniería genética se han convertido en una herramienta importante para desarrollar estrategias que controlen la rabia a nivel mundial. El desarrollo más importante ha sido el aislamiento de proteínas inmunogénicas y el empleo de virus de animales y plantas como vectores de clonación y expresión de proteínas heterólogas con el objetivo de producir vacunas de fácil distribución y estables a cualquier tipo de clima<sup>68</sup>.

La proteína G del virus de la rabia ha sido producida en plantas de jitomate<sup>69</sup>, tabaco<sup>70</sup>, zanahoria<sup>71</sup> y maíz<sup>72,73</sup>. La evaluación de la proteína G del virus de la rabia expresada en plantas transgénicas de maíz, como inmunógeno oral en ratones, permitiría posteriormente una inmunización oral en bovinos, cuya población en riesgo de adquirir la rabia parálitica bovina es superior a 10 millones de cabezas de ganado, evitando serios daños a la ganadería nacional y pérdidas económicas de millones de pesos<sup>3</sup>.

### **2.3.1 Respuesta Inmune a la Vacunación**

El antígeno administrado por vía oral, al pasar por la lamina propia debe ser fagocitado y procesado por células presentadoras de antígeno (APC), que estimulan la amplificación de linfocitos específicos generando mediadores de la inmunidad humoral y celular<sup>74</sup>. Ratones vacunados por vía intradermal con un virus modificado cepa ERA, produjo acumulación de linfocitos en nódulos linfáticos al tercer día después de la vacunación. Los niveles de anticuerpos neutralizantes inducidos alcanzaron los niveles máximos al 12 día en suero. La respuesta celular desapareció al 20 día post-inoculación, sin embargo, los niveles de anticuerpos neutralizantes se mantuvieron altos. Revacunaron a los 30 días como resultado se observó un incremento en la respuesta de linfocitos y en los niveles de anticuerpos neutralizantes contra el antígeno viral. El pico de la respuesta celular se identificó al segundo día y disminuyeron estos niveles al 16 día después de la infección, conservándose altos los niveles de anticuerpos circulantes<sup>75</sup>.

### **2.3.2 Inmunidad de Mucosas**

Las superficies mucosales están constantemente expuestas a una innumerable cantidad de antígenos. Relativamente pocas moléculas altamente inmunogénicas, al entrar en contacto con la superficie mucosal, generan una respuesta humoral. Las vacunas efectivas contra infecciones deben estimular el sistema inmune para la producción de IgA<sub>s</sub>, en las superficies mucosales del sistema respiratorio y digestivo. La respuesta inmune mucosal es inducida por vía oral más que parenteral. En comparación a la inmunización parenteral, la inmunización oral usa antígenos solubles o antígenos subunitarios vía IM. Por otra parte, los antígenos liberados en plantas comestibles permanecen estables al paso del estomago en cantidades suficientes para activar el sistema inmune. Se considera que las paredes externas de las células vegetales sirven como protección a los antígenos manteniéndolos aislados de las secreciones gástricas y liberándolos de manera gradual en los intestinos<sup>76</sup>.

### **2.3.3 Reacciones Adversas a la Vacunación**

Un factor importante para el tipo de respuesta inducida por un antígeno es la vía de administración, debido a que en un mismo animal, puede ocurrir tolerancia, desarrollo de hipersensibilidad e inducción de anticuerpos con memoria inmunológica. La respuesta inmunológica se dirige contra fragmentos de superficie del antígeno, definidos como determinantes antigénicos, los cuales difieren para cada antígeno. La producción de anticuerpos es específica contra el antígeno, siendo capaz de neutralizar al virus, inducir la fagocitosis y/o provocar hipersensibilidad de tipo mediato.

La inmunidad específica ligada a células depende principalmente de linfocitos T, que tienen la propiedad de actuar de manera específica, así como producir citotoxicidad<sup>77</sup>. La inducción de la respuesta inmune o la aparición de tolerancia, por vía mucosas depende de diversos factores incluidos: la especie, genética, edad del animal, dosis, forma (soluble vs. partícula, y activo vs. inactivado), la ruta y secuencia de administración del antígeno. Además, el uso de adyuvantes puede acentuar la inmunidad o la tolerancia. El efecto tolerogénico del antígeno administrado por mucosas se manifiesta exclusivamente por supresión de la respuesta de células T<sup>78</sup>.

#### **2.4 La Utilización de Plantas como Bioreactores en la Expresión de Proteínas Heterólogas para la Producción de Vacunas Comestibles**

Una planta transgénica es aquella que ha sido modificada genéticamente, es decir, se ha introducido un nuevo gen que pasa a constituir parte de su genoma, dicho gen (transgen) puede provenir tanto de una especie emparentada u otra totalmente distinta. La razón que explica que se puedan construir plantas transgénicas es la presencia universal de ADN en las células de todos los organismos vivos. Los genes son segmentos de ADN que codifican la información necesaria para conjuntar una proteína específica. Las proteínas funcionan entonces como enzimas que catalizan reacciones bioquímicas, o como unidades estructurales o de almacenamiento de una célula, y contribuyen a la expresión de una característica de la planta. Los procesos de transcripción y traducción son controlados por un conjunto de mecanismos reguladores, de tal modo que se produce una determinada proteína sólo cuando y donde sea necesaria<sup>79</sup>.



La inmunidad específica ligada a células depende principalmente de linfocitos T, que tienen la propiedad de actuar de manera específica, así como producir citotoxicidad<sup>77</sup>. La inducción de la respuesta inmune o la aparición de tolerancia, por vía mucosas depende de diversos factores incluidos: la especie, genética, edad del animal, dosis, forma (soluble vs. partícula, y activo vs. inactivado), la ruta y secuencia de administración del antígeno. Además, el uso de adyuvantes puede acentuar la inmunidad o la tolerancia. El efecto tolerogénico del antígeno administrado por mucosas se manifiesta exclusivamente por supresión de la respuesta de células T<sup>78</sup>.

#### **2.4 La Utilización de Plantas como Bioreactores en la Expresión de Proteínas Heterólogas para la Producción de Vacunas Comestibles**

Una planta transgénica es aquella que ha sido modificada genéticamente, es decir, se ha introducido un nuevo gen que pasa a constituir parte de su genoma, dicho gen (transgen) puede provenir tanto de una especie emparentada u otra totalmente distinta. La razón que explica que se puedan construir plantas transgénicas es la presencia universal de ADN en las células de todos los organismos vivos. Los genes son segmentos de ADN que codifican la información necesaria para conjuntar una proteína específica. Las proteínas funcionan entonces como enzimas que catalizan reacciones bioquímicas, o como unidades estructurales o de almacenamiento de una célula, y contribuyen a la expresión de una característica de la planta. Los procesos de transcripción y traducción son controlados por un conjunto de mecanismos reguladores, de tal modo que se produce una determinada proteína sólo cuando y donde sea necesaria<sup>79</sup>.

Una vez que se ha aislado y clonado un gen, debe ser sometido a varias modificaciones antes de que pueda ser efectivamente insertado en una planta<sup>80</sup>. Es preciso agregar una secuencia promotora para que el gen se exprese correctamente, el promotor es la llave de encendido y apagado que controla cuándo y dónde se expresará dicho gen en la planta. La mayoría de los promotores en las variedades de cultivos transgénicos son constitutivos, el promotor comúnmente utilizado es el CaMV35S, del virus del mosaico de la coliflor, que produce un alto grado de expresión en la planta. La secuencia de terminación indica a la maquinaria celular que se ha alcanzado el final de la secuencia génica<sup>81</sup>

El método de biobalística, ha sido especialmente útil en la transformación de especies de monocotiledóneas como el maíz y el arroz. Después del proceso de inserción del gen con un marcador, los tejidos de la planta son transferidos a un medio selectivo que contiene un antibiótico o un herbicida. Para la obtención de plantas completas a partir de tejidos transgénicos como los embriones inmaduros, se cultivan estos en condiciones ambientales controladas en una serie de medios que contienen nutrimentos y hormonas<sup>82</sup>. Una vez que se generan plantas completas y éstas producen semillas, comienza la evaluación de la progenie mediante técnicas como Southern blot y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para verificar que las plantas obtenidas al final del proceso han integrado al gen de manera estable, no basta con asumir que las plantas que han sobrevivido el proceso de selección con antibióticos es porque integraron los genes deseados a su genoma<sup>83, 84</sup>

### 2.4.1 Vacunas Comestibles

En la actualidad la vacunación constituye una de las principales prioridades de muchos países para prevenir un sin número de enfermedades tanto en humanos como en animales. Gracias a la adecuada aplicación de vacunas, existen enfermedades cuya incidencia ha disminuido de manera notable en países del tercer mundo. Idealmente la vacuna debe ser oral, de bajo costo y fácil distribución<sup>85</sup>. La definición de una vacuna comestible hecha por Arntzen<sup>86</sup>, se otorga a los productos comestibles, derivados de plantas, que contienen una subunidad recombinante activa administrada oralmente con la capacidad de proteger al individuo de la enfermedad. Se deben considerar tres aspectos importantes para la producción de inmunógenos: 1) El sistema de expresión debe producir proteínas que sean antigénicas, es decir; que sean reconocidas por anticuerpos del huésped en respuesta a un desafío; 2) las proteínas producidas deben ser inmunogénicas, es decir; que induzcan la producción de anticuerpos; y 3) que brinden protección a prueba de retos subsecuentes, contra los agentes patógenos que causan la enfermedad<sup>87</sup>. Diversos grupos de investigación han transformado plantas para utilizarlas como “bioreactores”, ya que se pueden expresar proteínas de alto valor de origen bacteriano, viral, humanos o animal, como encefalinas<sup>88</sup>, anticuerpos<sup>89</sup>, seroalbúmina humana<sup>90</sup> o interferón humano<sup>91</sup>. También se ha reportado que las plantas pueden ser empleadas para la producción y aplicación de vacunas orales debido a que las proteínas recombinantes conservan sus propiedades nativas (peso molecular y antigenicidad)<sup>92, 93, 94</sup>.

Las ventajas que pueden ofrecer la inmunización oral empleando plantas que expresen el gen de interés son entre otras <sup>95</sup>:

1. Menores costos de producción.
2. Facilidad de aplicación de la vacunas.
3. Mayor estabilidad de los biológicos.
4. Facilidad de distribución sin requerir refrigeración.
5. La relativa fácil manipulación genética, y
6. La modificación post-traducciona de proteínas eucariontes.

Estas características son requeridas en la búsqueda de nuevos biológicos, para establecer programas de vacunación masiva, que tengan un impacto relevante en la salud pública y veterinaria de nuestro país, y en otros países con problemas similares<sup>96</sup>.

#### **2.4.2 El Maíz como Sistema de Producción de Vacunas Comestibles**

Los cereales son plantas potenciales para la producción de vacunas comestibles. Las ventajas que proporcionan son: 1) Forman parte de la dieta de animales domésticos, silvestres e incluso humano; 2) contenido proteico del 8 al 10% de peso seco, lo que permite mejorar los niveles de expresión de la proteína recombinante; 3) almacenamiento de la proteína heteróloga durante largos periodos de tiempo; 4) procesamiento industrial y tecnología de producción ampliamente establecida. Las desventajas son: 1) El calor o la cocción puede causar desnaturalización y pobre inmunidad (la harina de maíz es la excepción); 2) potencial de entrecruzamiento en campo para algunas especies<sup>97</sup>.

La antigüedad del maíz data desde hace 7,000 años. Las culturas mesoamericanas basaban su economía en el cultivo de este cereal. Su composición química esta formada por un 8-10% de proteínas (zeína, edestina, maisina  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , etc.); 60 y 70% de almidón y azúcares, y del 4 al 8% de materias grasas, el resto hasta 100 % es agua, celulosa y sustancias minerales<sup>98</sup>.

## **2.6 Justificación**

Se considera el maíz como una opción viable para la producción de una vacuna comestible contra el virus de la rabia, debido a que este cereal proporciona diversas ventajas en cuanto a contenido proteínico, así como se caracteriza por ser un excelente sistema portador de antígeno. El contar con una vacuna transgénica de maíz contra el virus de la rabia proporcionaría una alternativa de inmunización, para reducir los costos de producción de biológicos, y permitir a las personas de bajos recursos el vacunar a sus animales y con ello disminuir las pérdidas económicas que cada año son mayores por esta enfermedad, ya que no requiere de complejos sistemas de refrigeración para la conservación de la proteína recombinante, facilitando campañas masivas de inmunización en cualquier territorio del país, sin la preocupación de que el inmunógeno pueda inactivarse o no contar con los títulos necesarios para proteger a los animales ante un desafío contra un virus de vampiro, principal transmisor de la rabia en México.

# **III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **3.1 HIPÓTESIS**

- La proteína G del virus de la rabia expresada en semillas de maíz transgénico, funcionará como inmunógeno oral en ratones, confiriendo protección ante el desafío con un virus de origen vampiro; principal transmisor de la rabia en México.

### **3.2 OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la respuesta inmune humoral y protectora de la proteína G del virus de la rabia en semillas transgénicas de maíz, mediante su administración oral en ratones.

### **3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Realizar un Western blot, para identificar la presencia de la proteína G del virus de la rabia en semillas transgénicas de maíz.
- Realizar una densitometría para cuantificar la proteína G recombinante y determinar el porcentaje de expresión en semillas de maíz transgénico, por gramo de peso seco.
- Realizar la prueba de inhibición de focos fluorescentes (RIFFT) para evaluar la inmunidad humoral mediante la detección de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia en sueros.
- Desafió con un virus proveniente de vampiro al día 90 post- inmunización, para evaluar el índice de protección que confiere la proteína G recombinante cuando es administrada por vía oral en ratones.<

# **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**



## **4 Materiales y Métodos**

La fase experimental de esta tesis, se llevo a cabo en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP-CENID Microbiología Animal), con financiamiento del proyecto CONACYT N°G34635B.

### **4.1 Material Biológico**

Semillas de maíz transformadas por biobalística con los plásmidos: PWR-21/pUBI que contiene al gen que codifica para la proteína G del virus de la rabia bajo el promotor de ubiquitina y el terminador 35S del virus del mosaico de la coliflor y PGHCNS-MARS con el mismo promotor, gen y terminador pero además una secuencia que codificaba para una región de adherencia a la membrana (MARS). Otorgadas por el Laboratorio de Plantas Tropicales y Salud Humana del Departamento de Ingeniería Genética del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional Unidad Irapuato<sup>72</sup>.

### **4.2 Identificación de la Proteína G del Virus de la Rabia en Semillas Transgénicas de Maíz**

La identificación de la proteína G del virus de la rabia se realizó a partir de una mezcla de los granos de maíz obtenidos de la transformación con los plásmidos PWR-21/pUBI y PGHCNS-MARS. Los granos de maíz transgénico (MTG), y no transformado (MNT) control negativo, fueron molidos en nitrógeno líquido, hasta obtener una harina fina y homogénea. Se pesaron 200 mg de harina de MTG y MNT y se colocaron en tubos previamente rotulados, a cada tubo se le añadió 400 µl de un amortiguador de lisis para proteínas en una proporción 2:1.

El tejido vegetal se homogenizó perfectamente por medio de agitación en mezclador (vortex), y se centrifugo a 100 xg por 15 minutos a 4° C, se recupero el sobrenadante y se depositaron en tubos nuevos. Nuevamente se centrifugaron bajo las mismas condiciones descritas anteriormente para obtener la mayor cantidad de proteínas solubles totales (PST).

Las proteínas solubles totales de las muestras MTG, MNT y virus de la rabia (VR) control positivo, se cuantificaron por medio de la técnica de Bradford para determinar la cantidad de  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  de cada uno de los extractos. Como referencia se utilizó una curva de albúmina sérica bovina (ASB), conociendo previamente las concentraciones contenidas. Las muestras fueron colocadas por triplicado para disminuir el grado de error en el programa de computo Microplate versión 5.0<sup>MR</sup> leídas con un filtro de 595 nm.

Las absorbancias de los extractos MTG, MTN y VR; así como las concentraciones de referencia de ASB 0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 12.5  $\mu\text{g}$  se promediaron y por medio de regresión se calculo la cantidad de proteína soluble total  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , para cada extracto. Las proteínas solubles totales fueron separadas por técnicas de electrofóresis en un SDS-PAGE, seguido de transferencia tipo Western blot, se preparó un gel de poliacrilamida al 10% (ver anexo1) y se cargaron 40  $\mu\text{g}$  de proteína soluble total de los extractos de MTG y MTN en diferentes pozos, para el control positivo (VR), solamente se colocó 1.5  $\mu\text{g}$  de proteínas virales.

La razón de solamente colocar 1.5 µg de las proteínas virales se debió a que en la partícula viral se esperaba comparar la proteína G viral, cuya expresión es mayor, comparada con la proteína recombinante. Los extractos de las proteínas solubles totales de MTG, MNT y VR; se mezclaron con una solución reguladora con azul de bromofenol el cual funciona como un trazador, ya que presenta una movilidad electrofóretica mayor al de algunas proteínas. Una vez que las muestras habían penetrado en el pozo correspondiente, el gel se corrió a 100 volts manteniendo el voltaje constante, hasta que el colorante alcanzó una distancia de 0.5 cm del borde del gel. La tinción del gel se realizó con azul de Coomassie durante 8 horas. Terminada la fijación y tinción el gel se colocó en un recipiente limpio y se procedió a desteñirlo con una solución decolorante compuesta de metanol, agua bidestilada y ácido acético glacial. Eliminado el exceso del colorante, el gel se enjuagó con agua y se secó para su fotodocumentación.

Además se realizó un gel de poliacrilamida al 10%, en el cual se encontraban concentraciones determinadas de albúmina sérica bovina (ASB), para cuantificar la proteína recombinante mediante densitometría y el análisis del programa Kodak 1D<sup>MR</sup>. El gel de ASB contenía concentraciones descendentes colocadas en los pozos en el siguiente orden: 1) 2.25; 2) 2.0; 3) 1.75; 4) 1.5; 5) 1.25; 6) 1.0; 7) 0.75; 8) 0.50, y 9) 0.25 µg, estas concentraciones se utilizaron como referencia para establecer la relación directa entre la cantidad en µg de proteína y el área de la banda. Al momento que se determinó dicha relación se procedió a cuantificar la proteína G recombinante, determinando que en las semillas de maíz transgénico la concentración era de 50 µg de proteína recombinante por gramo de peso seco.

### **4.3 Transferencia de las Proteínas Separadas en el Gel de Poliacrilamida a la Membrana de Nitrocelulosa (Western blot)**

Para la transferencia tipo Western blot, se corrió un gel de poliacrilamida al 10%, bajo las mismas condiciones de corrimiento (100 volts) descritas anteriormente para la realización del SDS-PAGE. Al término de la electroforesis se equilibraron con una solución de corrimiento al 20% de metanol durante 10 minutos los siguientes componentes: gel de poliacrilamida, membrana de nitrocelulosa y dos cojinetes de papel filtro. En el aparato de transferencia, primeramente fue colocado uno de los dos cojinetes de papel filtro, encima colocó la membrana de nitrocelulosa, seguido del gel de poliacrilamida, y por último en la parte superior se instaló el cojinete sobrante. Durante la formación del sándwich se evitó que entre los componentes (cojinete-membrana; membrana-gel; gel, cojinete), existiera la presencia de burbujas de aire con la intención de que el material proteico del gel se transfiriera adecuadamente a la membrana de nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo a 20 volts durante 45 minutos.

Posteriormente se retiró el cojinete superior, se tomo el gel y se colocó en un recipiente con colorante azul de coomasie para teñirlo con el objetivo de verificar la transferencia de material proteico del gel a la membrana de nitrocelulosa. Por otra parte la membrana de nitrocelulosa se colocó en un recipiente limpio y se agregó 40 ml de buffer de bloqueo al 3% de leche descremada en PBS, dejándolo en agitación toda la noche a 4°C con la intención de bloquear los sitios donde no se transfirió material proteico y para evitar la unión inespecífica de anticuerpos anti-proteína G.

Al siguiente día la membrana se lavó en tres ocasiones, con solución de lavado PBS Tween 0.2 % 10 minutos c/u en agitación constante. Al término se preparó el primer anticuerpo (suero hiperinmune de humano) en una concentración 1:250, diluido en PBS al 1% de leche descremada en 40 ml, se incubó la membrana en una cámara húmeda a 37°C durante 90 minutos.

A continuación se enjuagó nuevamente la membrana en tres ocasiones durante 10 minutos con la solución de lavado y se preparó el segundo anticuerpo anti-IgG de humano conjugado a peroxidasa, concentración 1: 6,000 diluido en PBS al 1% de leche descremada en 40 ml, el periodo de incubación fue de 1 hora a 37°C. La membrana se lavó nuevamente en tres ocasiones durante 10 minutos c/u con solución de lavado y un último lavado con PBS 1X, durante este lavado se preparó la solución de revelado (Apéndice 1), la cual se vertió sobre la membrana en agitación. Hasta que se observó la reacción cromogénica en la membrana, fue retirada de la solución de revelado y enjuagada con agua corriente, posteriormente se colocó en un trozo de papel absorbente para su posterior fotodocumentación.

#### **4.4 Preparación de la Pastilla de Inmunización**

Se buscó el método apropiado para la administración de la harina de maíz transgénica y no transformada para inmunizar oralmente a los ratones, determinando 50 µg de proteína G recombinante como dosis de inmunización. Las muestras se pesaron para cada uno de los grupos e individuos y se procedió a preparar las pastillas con la harina de maíz, la cual fue introducida en una jeringa de 5 ml y posteriormente se le agregó 1 ml. agua estéril, por medio de presión con

el embolo se elimino el excedente de agua quedando formada la pastilla. La inmunización oral se realizó al siguiente día, almacenando las pastillas a 4°C.

#### **4.5 Inmunización de los Animales por Vía Oral con la Proteína G Recombinante del Virus de la Rabia Expresada en Maíz Transgénico**

Previo a la inmunización se restringió el alimento, agua y los animales fueron separados en jaulas de manera individual para tener la certeza de que cada animal consumiera completamente la pastilla de maíz que contenía los 50 µg de la proteína G recombinante utilizada como dosis de inmunización. Además se administró una solución de bicarbonato de sodio al 4% en agua destilada estéril 60 µl/animal, con la finalidad de disminuir la acción de las enzimas digestivas, y permitir la llegada integra de la proteína G recombinante, al intestino delgado, mejorando su absorción y reconocimiento como antígeno. Los cuatro grupos estaban conformados por 10 ratones CD-1, hembras, de 11 semanas de edad, proporcionados por el Bioterio México para la evaluación de la inmunidad humoral mediante la detección de anticuerpos neutralizantes y determinando la inmunidad protectora reflejado en el índice de sobrevivencia conferida por la vacuna comestible.

#### **4.6 Análisis Estadístico**

El diseño experimental que se utilizó en este estudio fue completamente al azar. Para evaluar la respuesta humoral mediante la inducción de anticuerpos neutralizantes, los datos fueron analizados mediante ANOVA ( $p > 0.5$ ) implementado en el programa de cómputo Statistic GTM. Para la inmunidad protectora se realizó una gráfica de sobrevivencia con el mismo programa, para evaluar el índice de protección que confería la vacuna comestible. Así mismo se corroboró los resultados mediante la prueba de Kruskal Wallis y Mann Whitney entre los tratamientos, para comprobar que las variables son significativamente diferentes entre ellas.

#### **TRATAMIENTO:**

1. Una pastilla de harina de maíz transgénico por vía oral con 50  $\mu\text{g}$  de proteína G recombinante en una sola dosis, al inicio del experimento.
2. Una pastilla de harina de maíz transgénico vía oral con 50  $\mu\text{g}$  de proteína G recombinante + 5  $\mu\text{g}$  de toxina de cólera (SIGMA C-8052) como adyuvante oral en una sola dosis, al inicio del experimento.
3. Vacuna de virus activo modificado cepa ERA; una sola dosis (300  $\mu\text{l}$ ) por vía intramuscular, al inicio del experimento (control positivo).
4. Una pastilla de harina de maíz no transformada en una sola dosis al inicio del experimento (control negativo).

La toma de muestras para la parte serológica, se realizó a los días 15, 30, 45, 60, 75 y 90 post-inmunización, para medir los títulos de anticuerpos neutralizantes en unidades internacionales (UI) para cada tratamiento. Las muestras serológicas se obtuvieron a partir de 0.5 ml de sangre, la cual se centrifugó a 100 xg por 15 minutos, identificadas con el número de animal y el día del muestreo. A continuación el suero recolectado se transfirió a un tubo nuevo con los datos del animal y el grupo al que pertenecía. Los sueros se almacenaron a -20 °C, para realizarles la prueba rápida de inhibición de anticuerpos neutralizantes (RIFFT), y determinar el título de anticuerpos UI inducidos por la vacuna oral.

#### **4.7 Anestesia de los Animales para la Toma de Muestras Sanguíneas**

El anestésico utilizado para la toma de las muestras sanguíneas fue el éter dietílico, por lo tanto se seleccionó un área ventilada y en ausencias de flamas u otras fuentes de ignición, como medida de seguridad para el operador. El animal fue colocado en un receptáculo cerrado, que contenía un algodón empapado con anestésico, vigilando el estado físico del animal durante la anestesia. Con el animal anestesiado se tomo la muestra con un tubo capilar el cual se introdujo en la comisura del ojo realizando movimientos circulares para facilitar la salida de la muestra a través del tubo capilar, del otro extremo del tubo capilar se encontraba un tubo ependorff previamente identificado con los datos de la muestra. Al término de la toma de la muestra el animal fue regresado a su jaula y se confirmó que se encontrará en perfecto estado de salud posterior a la anestesia<sup>99</sup>.



#### **4.8 Condiciones de Alojamiento para los Grupos Experimentales**

El espacio vital por animal proporcionado fue de 97 cm<sup>2</sup>, satisfaciendo las necesidades fisiológicas (alimentación, defecación, micción u otros), y conductuales, permitiendo movimientos normales y ajustes posturales característicos de la especie. La temperatura del encierro primario osciló entre 20 a 24°C, con una humedad relativa aproximada de 50 a 70%. Diariamente se proporcionó agua limpia y fresca; y alimento comercial *ad libitum*, el cual satisfacía las necesidades nutricionales de los animales empleados en este estudio <sup>100, 101, 102,103</sup>.

#### **4.9 Prueba Rápida de Inhibición de Focos Fluorescentes para la Determinación de Anticuerpos Neutralizantes del Virus de la Rabia (RIFFT)**

Los sueros almacenados a -20° C (150 µl), fueron descongelados e inactivados a 56°C durante 30 minutos. Para determinar el título de anticuerpos neutralizantes presentes en suero, se realizó la prueba rápida de inhibición de focos fluorescentes (RIFFT), para cada una de las muestras, tal como lo describe Smith et al, 1996; Murrieta GF, 2004<sup>104, 105</sup>, a las 24 horas después se realizó la lectura de las placas y se determinó el título de anticuerpos en UI presentes en suero para cada tratamiento.

# **V. RESULTADOS**

## **5.1 Identificación de la Proteína G del Virus de la Rabia en Semillas Transgénicas de Maíz**

Resultado de la separación de las proteínas solubles totales mediante SDS-PAGE se identificó una banda correspondiente a la proteína G recombinante (carril 3), de similar peso molecular al de la proteína viral (carril 4), la cual no se encuentra presente en el control negativo MNT (carril 2). El peso molecular de la proteína G recombinante presento una ligera migración incrementando su peso molecular en comparación con la proteína viral. El análisis de estas bandas mediante el programa de computo Kodak 1D<sup>MR</sup>, mostró que la proteína G recombinante tenía un peso molecular de 75 kDa, mientras que el de la proteína viral fue de 74 kDa. Con estos datos podemos deducir que la proteína G expresada en semillas transgénicas de maíz, no se observa altamente modificada por los procesos de transcripción en el tejido vegetal, lo que pudiera afectar sus propiedades biológicas.

## **5.2 Cuantificación de la Proteína G Recombinante Expresada en Semillas Transgénicas de Maíz**

La cuantificación de la proteína G recombinante se realizó mediante una densitometría, para determinar la cantidad de la proteína G recombinante y el porcentaje de expresión en el sistema vegetal. Los resultados indicaron que un gramo de peso seco, contenía 50 µg de proteína G recombinante. Por lo tanto el porcentaje de expresión fue del 0.5% de la proteína soluble total del maíz. Estos datos fueron corroborados mediante el programa de cómputo Kodak 1D<sup>MR</sup>.

La diferencia entre ambos análisis fue que la densitometría determinó el tamaño del área de la banda, mientras que el programa de cómputo proporcionó los datos en píxeles de acuerdo a la luminiscencia que transmite. Lo relevante del segundo análisis es la estimación de los pesos moleculares de la proteína G recombinante (MTG), así como la proteína viral (VR). Cabe resaltar; que se analizó solamente la región del gel en donde se identificó la presencia de la proteína G recombinante, en esta región se observaron cuatro bandas en el carril 3, donde la segunda banda marcada de rojo presento un peso similar al de la proteína G viral. En el carril 2 control negativo solamente se observó la presencia de tres bandas, las cuales tenían pesos similares con las tres proteínas restantes del tercer carril (Figura2).

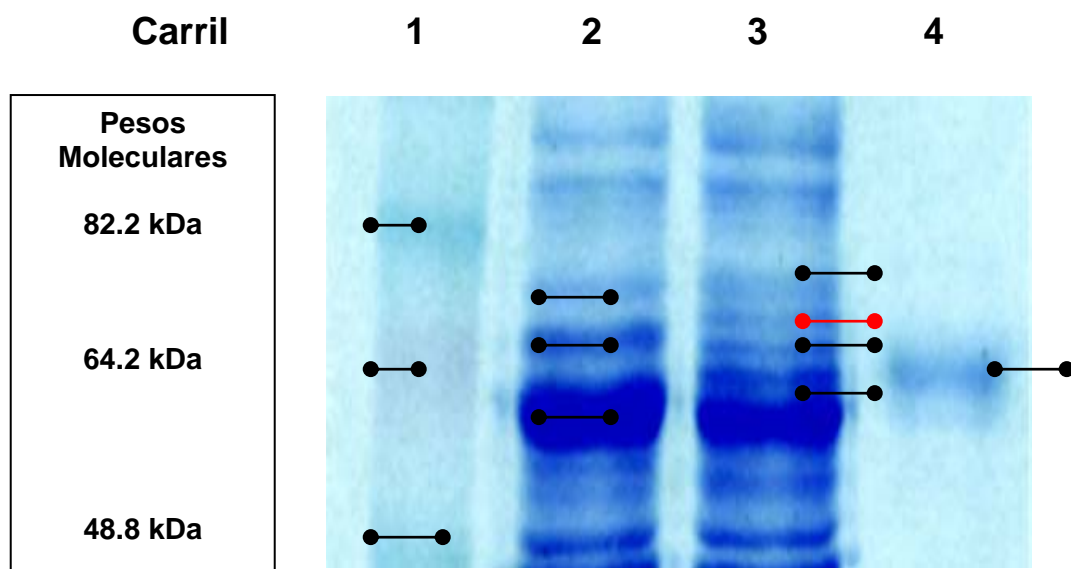


Figura 2. En el gel se observa la separación de las proteínas de acuerdo a su peso molecular. Carril 1.- Marcador Benchmark Protein Ladder; 2.- Proteínas de maíz no transformado; 3.- Proteínas de maíz transgénico; 4.- Proteína G viral. En el segundo y tercer carril se marcan el área donde se encuentra la proteína G recombinante (rojo), ausente en el carril 2 (MNT), y de peso similar a la proteína presente en el carril 4 (VR).

La cuantificación se llevo a cabo mediante una densitometría utilizando como referencia un gel de poliacrilamida con cantidades decrecientes de albúmina sérica bovina, la cual fungió como proteína control (Figura 3).

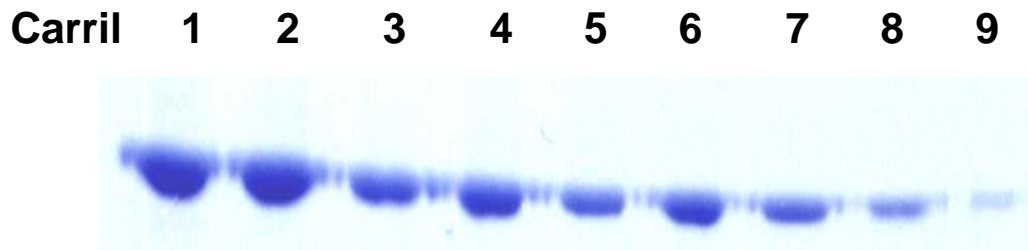


Figura 3.- Gel de poliacrilamida con concentraciones descendentes de albúmina sérica bovina (ASB). Carril 1.- 2.25 µg, 2.- 2.0 µg, 3.- 1.75 µg, 4.- 1.5 µg, 5.- 1.25 µg, 6.- 1.0 µg, 7.- 0.75 µg, 8.- 0.50 µg, 9.- 0.25 µg.

### 5.3 Transferencia de las Proteínas Separadas en el Gel de Poliacrilamida a la Membrana de Nitrocelulosa (Western blot)

Como resultado del Western blot realizado para la identificación de la proteína G del virus de la rabia en semillas de maíz transgénico, se corroboró la presencia de la banda identificada anteriormente mediante el SDS-PAGE. Confirmando la expresión de la proteína G del virus de la rabia en semillas de maíz transgénico, siendo reconocida por los anticuerpos específicos para dicha proteína y conservando el peso molecular y sus propiedades biológicas (Figura 4).

En la membrana se identificaron dos proteínas, una de ellas corresponde al peso molecular de 75 kDa (color rojo), reconocida por anticuerpos específicos para la proteína G del virus de la rabia (carril 4). Mientras que en el control negativo (carril 3), podemos ver la presencia de una sola banda de similar peso molecular a la restante del carril. En la transferencia se observa la misma relación entre los pesos moleculares de la proteína viral y recombinante, se reconoció que la proteína recombinante presentaba una ligera migración, por lo cual incrementaba su peso molecular, este incremento comparado con la proteína viral no fue significativo (Figura 4).

### WESTERN BLOT DE MAÍZ TRANSGÉNICO

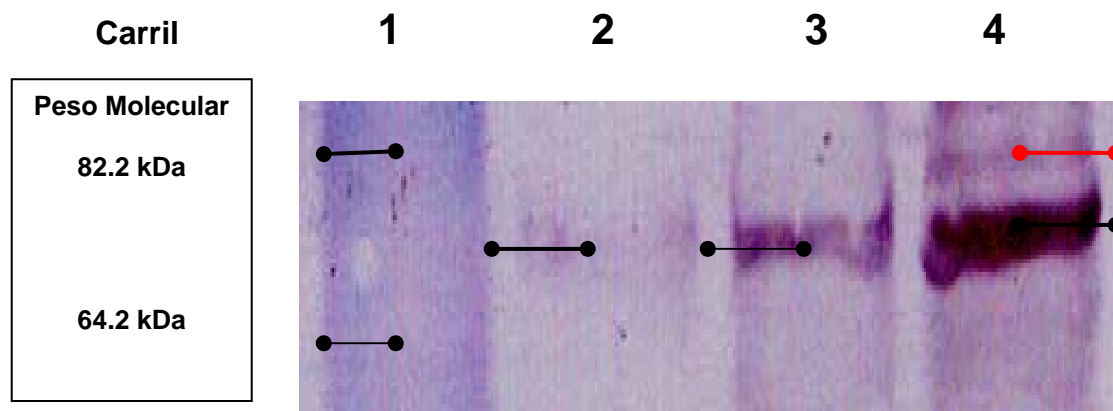


Figura 4.- Western blot Carril 1.- Marcador peso molecular, 2.- Proteína G viral (control positivo), 3.- Proteínas de maíz no transformado (control negativo), 4.- Proteína G recombinante de semillas de maíz transgénico. Se observa la presencia de una banda cuyo peso aproximado de 75 kDa solamente se encuentra en el MTG (color rojo), y de peso similar al de la proteína G viral.

A continuación se presentan los datos recopilados en el programa Kodak 1D<sup>MR</sup>. Los recuadros proporcionan los pesos moleculares de las proteínas del gel (PAGE-SDS), así como el área en píxeles de cada una de ellas. Los datos más relevantes es la ausencia de la proteína G recombinante del virus de la rabia en el maíz no transformado (MNT), cabe señalar que las demás proteínas presentan pesos moleculares similares para el maíz transgénico (MTG) como, para el no transformado (Tabla 1).

### ANÁLISIS DE LOS PESOS MOLECULARES DE LAS PROTEÍNAS EN EL PROGRAMA KODAK 1D<sup>MR</sup>

Marcador de Peso Molecular			Maíz no Transformado (MNT)		Maíz Transformado Proteína G (MTG)		Proteína G del Virus de la Rabia Cepa Era (VR)	
Banda	kDa	Área (pix)	kDa	Área (pix)	KDa	Área (pix)	kDa	Área (pix)
1	181.1	882	79.89	686	80.55	784	74.26	1127
2	115.5	1127	ausente	ausente	<u>75.59</u>	<u>539</u>		
3	82.2	1127	72.28	784	73.27	441		
4	48.8	1176	65.67	1372	65.33	1078		

Tabla 1.- Pesos moleculares aproximados de las proteínas analizadas por medio del programa Kodak 1D<sup>MR</sup>. En la sexta columna se observa el peso aproximado de la proteína G recombinante del virus de la rabia expresada en el maíz transgénico (MTG). Las proteínas no subrayadas, se identificaron como proteínas en común para el maíz transgénico como para el no transformado (MNT). En la octava columna se determinó el peso molecular de la proteína G viral (VR).

#### **5.4 Prueba Rápida de Inhibición de Focos Fluorescentes para la Determinación de Anticuerpos Neutralizantes del Virus de la Rabia (RIFFT)**

La detección de los niveles de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia se realizó mediante la prueba de inhibición de focos fluorescentes con los sueros recolectados de los diferentes tratamientos a los 15, 30, 45, 60, 75, y 90 días post-inmunización. Los resultados obtenidos fueron comparados mediante el análisis estadístico ANOVA ( $p < 0.05$ ) implementado en el programa de cómputo Statistic GTM, para determinar las diferencias estadísticas entre la inducción de anticuerpos neutralizantes para cada tratamiento y los días post-vacunación en los que se llevo a cabo la detección serológica. En los grupos inmunizados con MTG+TC y VR-G se detectaron los niveles de anticuerpos con títulos mayores a 0.5 UI (mínimo recomendado por la OMS), a partir del día 15 post-inmunización. Mientras que para el grupo inmunizado con MTG se detectaron los mismos niveles en los sueros del día 30. El grupo inmunizado con MTG+TC alcanzó el pico de anticuerpos al día 60 post-inmunización con una media de 0.8 UI, pero en dos últimos muestreos del día 75 y 90 se notó una disminución en los niveles de anticuerpos neutralizantes hasta alcanzar las 0.5 UI. Los animales inmunizados con la vacuna tradicional VR-G a comparación de los demás grupos siempre presentaron altos niveles de anticuerpos, por encima de las 0.5 UI. El grupo inmunizado con MTG presento al día 30 post-inmunización las 0.5 UI manteniendo estos niveles hasta el día 45; posteriormente en los sueros de los días 60, 75, 90 se identifica un incremento en los niveles de anticuerpos neutralizantes alcanzando 1.0 UI.



El grupo control negativo (MNT); como se esperaba no se observó la presencia de anticuerpos neutralizantes, a causa de que los animales no estuvieron en contacto con el antígeno (Figura 5).

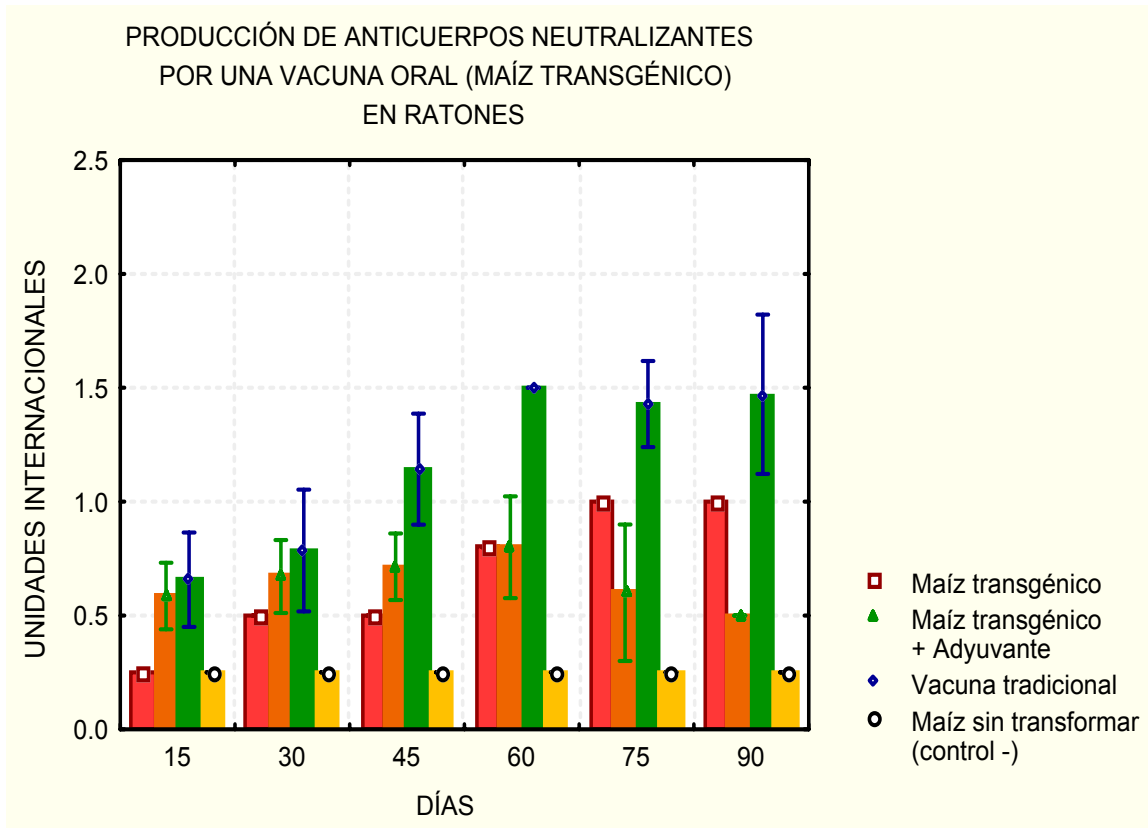


Figura 5.- Determinación de anticuerpos neutralizantes producidos por una vacuna comestible. 1) Maíz transformado con la proteína G del virus de la rabia (color rojo); 2) Maíz transformado con la proteína G del virus de la rabia + Adyuvante (color café); 3) Vacuna tradicional de virus vivo modificado; y 4) Control negativo (MNT).

Además en el mismo programa se realizó un análisis para observar las interacciones entre medias interpretando el comportamiento de cada tratamiento en relación con la inducción de anticuerpos neutralizantes para el virus de la rabia en UI. Al observar la gráfica el grupo inmunizado con MTG (color azul) presenta la misma inducción de anticuerpos neutralizantes al día 60 comparado con el grupo con adyuvante MTG+TC (color rojo).

En los muestreos consecutivos para el tratamiento MTG se incrementa los niveles de anticuerpos hasta alcanzar 1.0 UI, mientras que en el segundo caso los niveles de anticuerpos disminuyen hasta alcanzar los valores mínimos recomendados por la OMS. Otro dato importante es que el nivel de anticuerpos para el tratamiento con MTG es menor a los obtenidos en una inmunización con una vacuna tradicional VR-G durante toda la fase experimental (color verde), este resultado puede deberse a que en la dosis administrada con la vacuna tradicional 300  $\mu$ l/animal, contenían más de 50  $\mu$ g de proteína G pura. Por último el grupo control negativo no presento respuesta inmunológica, como se muestra en la gráfica (color rosa) (Figura 6).

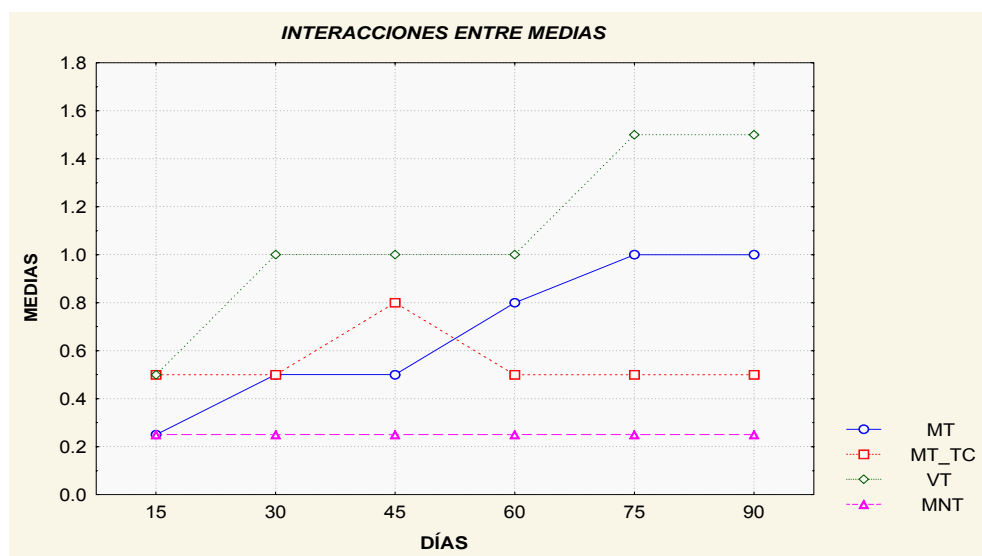


Figura 6. En la gráfica se puede observar las interacciones entre medias para cada tratamiento en relación con la inducción de anticuerpos neutralizantes para el virus de la rabia. Se determinó que los tratamientos eran independientes. Maíz transgénico con la proteína G del virus de la rabia (MT azul); Maíz transgénico con la proteína G del virus de la rabia +adyuvante MT+TC (rojo); Vacuna tradicional antirrábica VT (verde); Maíz sin transformar MNT (rosa).

Se determinó por medio del análisis estadístico ANOVA que todos los tratamientos se comportaron de manera independiente, sin embargo se realizaron pruebas complementarias que pudieran cumplir la premisa de homogeneidad de varianzas sobre la cual descansa el ANOVA. Por tal motivo los datos fueron sometidos a la prueba de Kruskal Wallis complementada con Mann-Whitney, si se tenían razones para dudar de la igualdad de varianzas. Para la prueba se planteo la Ho: Donde no existía ninguna asociación entre el tipo de tratamiento con la inducción de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia; y la Ha: Donde si existía asociación entre el tipo de tratamiento con la inducción de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia. Por lo tanto Si  $X^2_c > X^2$  tablas  $\rightarrow$  se rechazaba la Ho. Significa que: “Si existe asociación entre el tipo de tratamiento con la inducción de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia (Tabla 2).

Grupo Control-& Día de Medición	Grupo o Tipo de Tratamiento						KrusKall-Wallis			
	2. Vacuna tradicional (VT)		3 Maíz Transgénico (MTG)		4 Maíz con adyuvante (MTG+TC)		1 cola $X^2_{(3gl)}$ P		2 colas $X^2_{(3gl)}$ P	
	*Z	P> Z	*Z	P> Z	*Z	P> Z				
15	-3.403	0.0007	<u>Sin Dato</u>		-3.435	0.0006	20.361	0.0001	24.243	0.0001
30	-3.403	0.0007	-3.606	0.0003	-3.403	0.0007	17.960	0.0004	20.419	0.0001
45	-3.435	0.0006	-3.606	0.0003	-3.435	0.0006	24.103	0.0001	25.625	0.0001
60	-3.606	0.0003	-3.606	0.0003	-3.368	0.0008	22.862	0.0001	24.448	0.0001
75	-3.500	0.0005	-3.606	0.0003	-3.321	0.0009	23.667	0.0001	25.091	0.0001
90	-3.430	0.0006	-3.606	0.0003	-3.606	0.0003	24.103	0.0001	25.411	0.0001

Tabla 2 Resultados de la Prueba de Kruskal Wallis complementada con Mann Whitney (\*Z).

En la tabla anterior se comparó al grupo control con los demás grupos experimentales, teniendo  $X^2_{(3gl)}(0.05) = 7.81$  por lo tanto, permite rechazar la  $H_0$  en todos los casos  $X^2$  encontrada  $> X^2$  tablas. Así mismo se puede concluir que los tratamientos son independientes y sus variables son estadísticamente significativas mediante la prueba de Kruskal Wallis complementada con Mann-Whitney.

### **5.5 Eficacia de la Vacuna Comestible Administrada por Vía Oral en Ratones**

Para la inmunidad protectora de la vacuna comestible mediante el porcentaje de sobrevivencia, los grupos fueron desafiados al día 90 post-inmunización con un virus de la rabia proveniente de vampiro dosis letal 50% ( $DL_{50\%}$ ), por vía intracerebral. A partir del octavo día post-desafío los animales del grupo con adyuvante (MTG+TC), así como el grupo control negativo (MST) comenzaron a presentar signología de la enfermedad de la rabia seguida de muerte, los animales fueron recolectados para confirmar el diagnóstico mediante la prueba de inmunofluorescencia directa (IFD).

Los animales que no murieron se consideraron protegidos, interesantemente el 100% de los animales alimentados con semillas transgénicas que contenían la proteína G del virus de la rabia (MTG), y que indujeron niveles mayores a los recomendados como mínimos por la OMS (0.5 UI), quedaron protegidos, al igual que el inmunizado con la vacuna tradicional del virus de la rabia (V-RG). Aunque los títulos de los anticuerpos inducidos por la proteína G recombinante no tuvo un comportamiento similar al de los inducidos por la vacuna tradicional, el porcentaje de protección, para ambos grupos fue el mismo.

Por tal motivo, podemos deducir que 50 µg de tejido transgénico es suficiente para inmunizar a un animal y protegerlo contra el desafío con un virus de la rabia letal proveniente de vampiro (Figura 7).

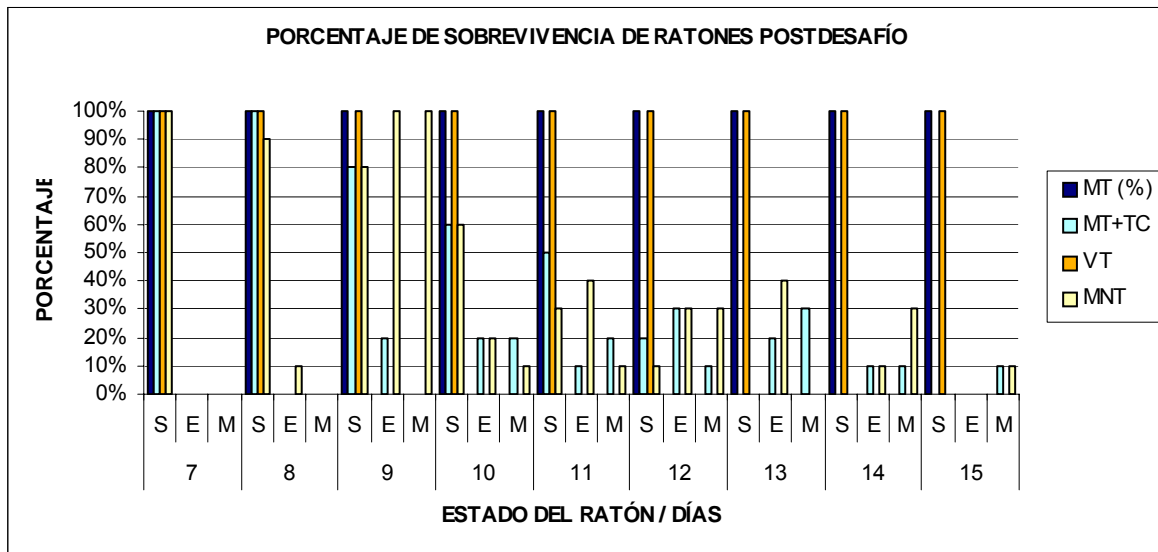


Figura 7. Se muestra la presencia de signología contra el virus de la rabia, conforme pasan los días post-desafío. En la gráfica se observan a los animales sanos (S), enfermos (E) y muertos (M) por grupo. Maíz transgénico con la proteína G del virus de la rabia (MT color azul); Maíz transgénico con la proteína G del virus de la rabia + adyuvante (MT+TC color azul cielo); Vacuna tradicional (VT color naranja); Maíz no transformado (MNT color amarillo).

# **VI. DISCUSIÓN**

## 6. Discusión

Los datos revelados en nuestro estudio determinaron que una dosis de 50 µg de proteína G recombinante, es suficiente para proporcionar una protección al 100% en ratones ante el desafío con un virus de origen vampiro, principal transmisor de la rabia en México. La proteína G del virus de la rabia expresada en plantas transgénicas de maíz fue capaz de inducir la respuesta inmune humoral a través de la inducción de anticuerpos neutralizantes en concentraciones mayores de 0.5 UI recomendadas por la OMS. Entre las vacunas comestibles para uso humano se encuentran: La enterotoxina *E. coli*, expresada en plantas de tabaco, papa y maíz<sup>106,107</sup>; el virus de hepatitis B expresada en tabaco, papa y lechuga<sup>108, 109</sup>; el virus de Norwalk expresada en tabaco y papa<sup>107</sup>. En el campo veterinario también se han desarrollado la expresión de antígenos derivados en plantas, y evaluados como inmunógenos orales para las siguientes enfermedades: La enfermedad hemorrágica del conejo expresada en papa, el coronavirus que produce la Gastroenteritis transmisible del cerdo en tabaco, maíz y papa<sup>110</sup>, etc. La proteína G del virus de la rabia también ha sido expresada en otros vegetales como jitomate<sup>69</sup>, zanahoria<sup>71</sup>, y maíz<sup>72, 73</sup>. El porcentaje de expresión de la proteína G, reportado en plantas de zanahoria fue del 1%; mientras que en el maíz solo se expresó el 0.5%. De tal manera que la zanahoria presenta el doble de expresión que el maíz. Sin embargo; los datos recolectados en la inmunidad humoral y protectora, que confirió su consumo oral en ambos casos, determinó que el maíz sirve como un excelente vehículo para la presentación del antígeno proteico, mejorando su absorción en el intestino delgado, lo que se reflejó en el 100% de

protección de animales inmunizados, mientras que para la zanahoria solamente confirió una protección del 66% de los animales inmunizados, ante un desafío contra un virus de origen vampiro<sup>71</sup>. Otro estudio reveló que la inmunización de ratones por vía intraperitoneal, así como oral con tejido de espinaca que contenía un péptido quimérico del virus de la rabia, indujo la producción de inmunoglobulinas (Ig) G y A, pero al momento del desafío con una dosis letal, la sobrevivencia de los animales solamente fue del 40%<sup>108</sup>. El maíz como sistema de expresión de antígenos, ha tomado relevancia en la producción de vacunas comestibles, debido al aceptable porcentaje de expresión de la proteína recombinante, así como su eficiencia al liberar el antígeno en el tracto digestivo comparado con otros vegetales. Se expresaron las glicoproteínas antigénicas de la Hemaglutinina-Neuraminidasa y de la proteína de fusión del virus de la enfermedad aviar de Newcastle patotipo La Sota en maíz bajo el mismo promotor CaMV 35S empleando co-bombardeo de partículas<sup>111</sup>. Se inmunizaron pollos con el maíz transformado que expresaban las dos proteínas (hemaglutinina-neuraminidasa y la proteína de fusión). En los sueros de los animales vacunados se realizaron pruebas serológicas de ELISA y se detectó una respuesta a partir del día 30 post- inmunización (producción de anticuerpos neutralizantes). Resultados similares fueron recolectados en nuestro estudio donde la detección de anticuerpos neutralizantes para el grupo MTG, se observó después del día 30 con los valores recomendados por la OMS (0.5 UI). Demostrando que el maíz al interior del organismo funciona como un excelente sistema portador de antígeno, siendo reconocido por los mecanismos de defensa del tracto digestivo, y manteniendo a la proteína recombinante sin alterar su capacidad inmunogénica.



El empleo de la toxina de cólera como adyuvante mucosal, en algunos reportes ha otorgado buenos resultados en la potencialización de la respuesta inmune ante el agente patógeno. Un ejemplo es el caso de la F4 (rFaeG) que fue administrada de manera oral, con un adyuvante mucosal (TC), en cerdos, los cuales aumentaron de manera significativa la inducción de la respuesta humoral y celular para F4 <sup>112</sup>. En contraste ratones inmunizados por vía intraperitoneal como oral, con 0 a 100 µg de VLP2/6 utilizando 5 µg de toxina de cólera como adyuvante, observaron que la respuesta inmune mucosal para VLP2/6 era potencializada al ser administrado el tratamiento por vía intraperitoneal, pero no para la administración oral donde no se observó diferencia alguna con ó sin el uso del adyuvante <sup>113</sup>. En nuestro estudio los niveles de anticuerpos detectados en cada tratamiento, mostraron que el grupo MTG+TC indujo la presencia de anticuerpos neutralizantes más rápidamente que en el grupo con la proteína recombinante sola por la co-administración del adyuvante, sin embargo; la inducción de anticuerpos para los dos últimos muestreos se observa un incremento en el título de anticuerpos para la proteína sola mientras que el grupo con adyuvante disminuye a los valores mínimos recomendados. Al desafió con una dosis letal<sub>50%</sub>, los animales presentaron signología de rabia y murieron. Otra publicación indica que ratones inmunizados con altas dosis de toxina de cólera, inducían bajos niveles de anticuerpos específicos<sup>114</sup>. Esto concuerda en nuestro estudio debido a que la respuesta inmune no pudo conservarse a lo largo de los diferentes tiempos de medición. Otros reportes indican que la alta concentración de toxina de cólera purificada administrada en humanos por vía oral (5 µg), fue suficiente para inducir diarrea al poco rato de la ingestión.

Por tal motivo, la inducción de la respuesta inmune, con la co-administración de adyuva

### **Invitrogen<sup>MR</sup>**

ntes mucosales (TC y enterotoxina de *E. coli*), depende de determinar la dosis apropiada de administración, para obtener los efectos esperados<sup>115, 116</sup>. El establecimiento de plantas comestibles para una inmunización basada en la expresión de antígenos microbianos representa una alternativa económica para la producción de nuevas vacunas de fácil distribución y administración en todo el territorio de nuestro país.

En nuestro estudio el porcentaje de expresión de la proteína G en semillas transgénicas de maíz fue del 0.5%, teniendo presente 50 µg de proteína recombinante por gramo de peso seco. En comparación con otros sistemas vegetales utilizados para la producción de antígenos, como la subunidad B de la enterotoxina de *E coli* (rec LT-B), en tubérculos de papa, notificaron de 10 a 17 µg por gramo de peso fresco de la proteína recombinante<sup>106</sup>; la expresión del gen F 18 derivados de serotipos de *E. coli* expresada en tabaco tuvieron un porcentaje de expresión del 0.1% de la proteína soluble total<sup>117</sup>. Existe una publicación de la expresión en plantas transgénicas del péptido de 21-mer, él cual proporciona protección contra el parvovirus canino, el estudio revela que obtuvieron el 3% de expresión en la proteína soluble total de la proteína recombinante, se pensó que este porcentaje tan alto de expresión se debía a la fusión del traductor aminoterminal con el gen GUS<sup>118</sup>.

Con respecto al peso aproximado de la proteína, se determinó que fue de aproximadamente 75 kDa. En comparación con el peso molecular de la proteína viral nativa (74 kDa), la proteína expresada en el sistema vegetal presenta una migración que incrementa su peso molecular. Otros estudios realizados coinciden con nuestros resultados, en la expresión de la (rec LT-B), al ser analizado a través de Western blot, detectaron, un ligero incremento en el peso molecular de la rec LT-B recombinante comparada con la LT-B bacteriana.

La diferencia según la describen los autores, podría ser la consecuencia de la adición de un enlace flexible y la retención de la señal al extremo carboxiterminal en el retículo endoplásmico. Esto puede estar asociado a que una vez terminada la translocación las proteínas se pliegan, adoptando su conformación nativa. La mayoría de las proteínas de secreción son procesadas mediante otra secuencia de modificaciones post-traduccionales, las cuales son esenciales para que las proteínas puedan cumplir su papel en la economía del organismo. Así durante su paso a través del sistema endomembranoso, las proteínas se someten a la formación de puentes di-sulfuro, glicosilación, sulfatación, fosforilación. En el aparato de Golgi se llevan actividades biosintéticas, por ejemplo; el grado de glicosilación se ve modificado y aumentado por glicosidasas y glicosil transferasas. Mientras que en las cisternas mediales se eliminan residuos de manosa y se añade residuos de N-acetilglucosamina, mientras que residuos de galactosa, ácido siálico y manosa aumentan la glicosilación en las cisternas terminales trans <sup>119</sup>.

En este estudio se comprobó que aunque existe un incremento en el peso molecular de la proteína G recombinante, por posibles procesos de glicosilación de la glicoproteína en el sistema vegetal, no se observó ninguna modificación en su capacidad antigénica.

# **VII. CONCLUSIONES**

## VII Conclusiones

- Se identificó a la proteína G del virus de la rabia en semillas de maíz transgénico, por medio del método de Western blot, estableciendo el porcentaje de expresión de la proteína recombinante siendo de 0.5% de la proteína soluble total cuantificada por SDS-PAGE y densitometría.
- Se confirmó la inducción de anticuerpos neutralizantes para el virus de la rabia, mediante la prueba de RIFFT, en los animales inmunizados con la proteína G recombinante por vía oral, en títulos mayores a 0.5 UI, recomendados por la OMS.
- Se corroboró que con dosis de 50 µg de la proteína G recombinante, administrada por vía oral en ratones, brinda el 100% de protección ante el desafío con un virus de la rabia procedente de vampiro, principal transmisor de la rabia en México.
- Se comprobó que la proteína G del virus de la rabia expresada en plantas transgénicas de maíz conservan sus propiedades inmunogénicas, para ser administrada como vacuna oral en ratones.

# **APENDICE 1**

## **MEDIOS Y SOLUCIONES**

### **Solución Salina Fosfatada (PBS)**

NaCl.....	8 g
KCl.....	0.20 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	1.15 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0.20 g

Se afora en 1 litro de agua destilada y se ajusta el pH de 7.2 a 7.4, y se almacena en refrigeración -4°C.

### **Amortiguador de Bloqueo**

3% Leche descremada.....	3 g
PBS.....	100 ml

### **Amortiguador de Lavado**

0.2% Tween 20.....	0.2 ml
PBS.....	100 ml

### **Amortiguador de Transferencia**

25mM Tris.....	3.02 g
193mM Glicina.....	14.48 g
20% Metanol.....	20 ml
Agua bidestilada.....	c.b.p. 1 Lt

**Nota:** Antes de aforar los tres reactivos se mezclan y se disuelven en 500 ml, se ajusta el pH a 8.3 con HCL concentrado, y se afora posteriormente.

### **Coomasie para PAGE**

Agua bidestilada.....	227 ml
Metanol absoluto.....	227 ml
Ácido acético glacial.....	45 ml
Coomasie R250.....	1.25 g

**Nota:** Disolver con agitación y almacenar en un frasco ámbar. El reactivo es estable y reciclable en estas condiciones.



### **Solución Decolorante para PAGE**

Agua bidestilada.....	227 ml
Metanol absoluto.....	227 ml
Ácido acético glacial.....	45 ml

**Nota:** El reactivo es reciclable filtrándolo en carbón activado, se desecha cuando presenta una coloración azul muy fuerte. El gel se sumerge en el reactivo en agitación constante, y realizando cambios constantes del mismo. Hasta obtener la visibilidad de las bandas.

### **Solución de Revelado**

PBS.....	60 ml
Diaminobenzina.....	30 mg
Peroxido (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	30 µl

### **Buffer de corrimiento**

Tris base.....	3.03 g
Dodecyl sulfato de sodio (SDS).....	1.0 g
Glicina.....	14.4 g
Agua desionizada.....	1,000 ml

## VIII) Referencias Bibliográficas

- 1) Pasteur L. Méthode pour prévenir la rage apres morsure. Compté Rendus Acad Sci, Paris 1885; 17: 765-774.
- 2) Organización Panamericana de la Salud (OPS). Informe de la IV Reunión de Directores Nacionales de Rabia (REDIPRA). Washington D. C. 1992.
- 3) N. Acha P, Zcifres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Organización Panamericana de la Salud, 3ra edición, 351-382; 2003.
- 4) Dietzshold B, Rupprecht CE, Tollis M, Lafon M, Mattei J, Wiktor TJ. Antigenic diversity of the glycoprotein and nucleocapsid proteins of rabies and rabies related viruses: implications for epidemiology and rabies control, Rev Infect Dis 1998; 10: S285- S798.
- 5) Frasser CF, Hooper PT, Lunt RA, Gould LI, Hytta AD, Russell GM, Kattenbelt JA. Encephalitis caused by a Lyssavirus in fruit bats in Australia. Emer Infect Dis 1996; 2: 327-331.
- 6) Ban E, New virus leaves questions hanging. Nature Med. 1997; 3: 5.
- 7) Bourhy H, Kissi B, Tordo N. Molecular diversity of the Lyssavirus genus.1993.
- 8) Tordo N, Bourhy H, Sacramento D. PCR technology for Lyssavirus diagnosis. In: The polymerase chain reaction for human diagnosis (Clewley JP, eds). CRC Press, London, 125-145.
- 9) Arai, Y.T., Kuzmin LV., Kameoka, Y., Botvinkin, A. D. New lyssavirus genotype from the lesser mouse-eared bat (*Myotis blyhi*), Kyrgyzstan. Emer. Infect. Dis 2003: 9, 333-337
- 10) Kuzmin, I. V. Orciari L. A, Arai, Y. T., Smith, J. S. Hanlon, C. A. Kameica, Y., Rupphecht C. E. Bat Lyssaviruses (ARAVAN KHUV( from central Asia: phylogenetic relationship according to NIP and gene sequences. Virus Res. 2003. 97, 65-79.
- 11) Botvinkin, A. D., Poleschuk, E. M., Kuzmin, I. V., Borisoa, T. I., Gazaryan, S. V. Yager, P., Rupphecht, C. E. Novel lyssaviruses isolated from bats in Russia. 2003. Emerg. Infect Dis. 9, 1623- 1625.
- 12) Cathleen A. Hanlon, Ivan V. Kuzmin, Jesse D. Blanton, William C. Weldon, Jamie S. Manangan, Charles E Rupprecht. Efficacy of rabies biologics against new lyssaviruses from Eurasia. Virus Research II. 2005, 44-54-

- 13) Vargas GR, Cárdenas LJ. Epidemiología de la rabia: situación actual en México. En Moreno CR, ed. Cienc Vet. México, D.F. U.N.A.M; 1996:332-360.
- 14) Flores CR. Rabia en humanos transmitida por murciélagos vampiros en países de América. *Téc Pecu Méx*; 1991:23-33.
- 15) Loza-Rubio E, Aguilar S, Bahloul C, Brochier B, Pastoret PP, Tordo N. Discrimination between epidemiological cycles of rabies in México. *Arch Med Res* 1999; 30: 1444-149.
- 16) De Mattos CC, De Mattos CA, Loza- Rubio E, Aguilar S, Orciari L, Smith J. Molecular characterization of rabies virus isolates from México: implications for transmission dynamics and human risk. *Am J Trop Med Hyg* 1999; 61: 587-597.
- 17) Bourhy H, Rotivel Y. Récents développements diagnostiques et épidémiologiques concernant la rage. *Le point vétérinaire*, vol. 27, n°167, avril 1995.
- 18) Koser, LM, Mc Gettinger, PJ, Tan, SG, Smith, EM, Korpwski, H, Dietzchold, B, Schell, JM. Rabies virus nucleoprotein as a carrier foreign antigen *PNAS* 101; 2004: 9495-9410.
- 19) Toriumi, H, Kawal A. Association of rabies virus nominal phosphoprotein (P) with viral nucleocapsid (NC) is enhanced by phosphorylation of the viral nucleoprotein (N). *Microbiol Immunol* 48; 2004: 399-409
- 20) Poch O, Blumberg B. M, Bougueleret L. and Tordo N. Sequence comparison of five polymerases (L Proteins) of unsegmented Negative-Strand RNA Viruses: Theoretical Assignment of Functional Domains 1990. *J Gen Virol* 7: 1153-1162
- 21) Wunner, WH, Palatroni, C, Curtis, PJ. Selection of genetic inhibitors of rabies virus. *Arch Virol* 149; 2004: 1653-1662.
- 22) Delagneau JF, Perrin P, Atanasiu P, Structure of the rabies virus: spatial relationships of the proteins G, M1, M2, and N. *Ann Virol* 1981; 132: 473-493.
- 23) Gaudin Y, Ruigrok RWH, Tuffereau C, Knosow M, Flamand A. Rabies virus glycoprotein is a trimmer. *Virol* 1992; 187: 627-632.
- 24) Drings A, Jallet C, Chambert B, Tordo N, Perrin P. Is there an advantage to including the nucleoprotein in rabies glycoprotein in subunit vaccine. *Vaccine* 17; 1999: 1549-1557.

- 25) Kankanamge PJ, Irie T, Mannem K, Tochicura TS, Kawai A. Mapping of the low pH-sensitive conformational epitope of rabies virus glycoprotein recognized by a monoclonal antibody # 1-30-44. *Microbiol Immunol* 47; 2003: 507-519.
- 26) Tordo N, Poch O, Structure of rabies virus. In: Campbell JB, Charlton KM (Eds). *Rabies*. Kluwer Ac Publ. Boston, USA; 1998:25-45
- 27) Kawal A, Morimoto K, Functional aspects of Lyssavirus proteins. In: Lyssavirus Rupprecht CE, Dietzschold B, Koprowski (eds), Springer Verlag, Berlin. 1994, 27-42.
- 28) Drings A. Impfung dies Europäischen Lyssaviren-ein struktureller und immunologischer Ansatz. Inaugural Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Veterinarmedizin. Freien Universitat Berlin. 1998.
- 29) Brochier B, Languet B, Blancou J, Kieny MP, Lecocq JP, Costy F, Desmettre P, Pastoret PP. Use of recombinant vaccinia-virus for oral vaccination of foxes cubs (*Vulpes Vulpes*) against rabies. *Vet Microbiol*, 1998; 18:103-108.
- 30) Nadin-Davis SA, Casey GA, Wandeler AI, Identification of regional variants of the rabies virus within the Canadian province of Ontario. *J Gen Virol*, 1994; 74: 829-837.
- 31) Smith JS, Orciari L, Yager P. Molecular epidemiology of rabies in US. *Semin Virol*, 1995; 6: 387-400.
- 32) Vargas GR, Cárdenas LJ. Epidemiología de la rabia: situación actual en México. En Moreno CR, ed. *Cienc Vet. México*, D.F. U.N.A.M; 1996:332-360.
- 33) Flores CR. Rabia en humanos transmitida por murciélagos vampiros en países de América. *Téc Pecu Méx*; 1991:23-33.
- 34) Favi CM, Yung PV, Pavletic BC, Ramirez VE, Role of insectivorous bats in the transmission of rabies in Chile. Antigenic characterization of field isolates. The 8<sup>th</sup> Annual Rabies in the Americas Conference; 1997 November 2-6; Kingston (Ontario Canada. Kingston (Canada) Queen's University 1997. 37.
- 35) Loza-Rubio E, De Mattos CC, Aguilar S, De Mattos CA. Aislamiento y caracterización molecular de un virus rábico obtenido de un murciélago no hematófago en la ciudad de México. *Vet Méx* 2000.
- 36) Geo. F. Brooks, Stephen A. Morse, Janet S. Butel. *Microbiología médica de Jawetz, Melnick y Adelberg*. Ed. El Manual Moderno 1998 Mex. D. F. 648

- 37) Dietzschold B. Rhabdoviruses. In Fields Virology 3rd ed. Fields BN et al (editors) Lippincott-Raven, 1996.
- 38) Fishbein D B, Robinson LE: Rabies N. *ngl J Med* 1993 ; 1 : 317
- 39) Thiravat Hemachudha, Jiraporn Laothamatas, and Charles E Ruppecht. Human rabies: a disease of complex neuropathogenic mechanisms and diagnostic challenges. *The Lancet Neurology* 01 June 2002; vol 1 Number 2
- 40) Valero G, Dante V González, Juan I Monroy. Sociedad de Médicos Veterinarios A. C. Diagnóstico Veterinario de rabia. Capítulo II; 1990: 88-98.
- 41) Fuenzalida E, Acha PN, Atanasiu P, Larghi O, Szyfres B. Rabies immunity in vaccinated cattle. *Proc 73 rd Annu Mtng US Anim Hlth Assoc*, 1969, pp307-322.
- 42) Abelseth MK. Bovine Vaccines, Past and Present in: *The Natural History of Rabies*, Baer GM, ed. Academic 1975: 203-219.
- 43) Pan American Health Organization (PAHO). 13 th Inter-America meetig at the ministerial level on health an agriculture. Report of the veterinary Public Health Unit of PAHO on compliance with the strategic and programmatic orientations, 1990-2002. Washington, D. C. 2003.
- 44) A Belloto, L. F. Leanes, M. C. Schneider, H. Tamayo, E. Correa. Overview of rabies in the Americas. *Virus Research III* 2005: 5-12.
- 45) Organización Panamericana de la Salud (OPS). Situación de salud en las Américas, indicadores básicos. 2002.
- 46) Garay SR (OPS México). Situación Actual de la Rabia en el Continente Americano. 1er. Encuentro Nacional de Laboratorios de Diagnóstico de Rabia. CENASA, Tecámac, Estado de México. Sept 26-30, 2005.
- 47) Organización Panamericana de la Salud(OPS). Estrategia y plan de acción para la eliminación de la rabia urbana en América Latina para el final de la década de 1980. Guayaquil 1983.
- 48) Trejo CJL, Control de brote de rabia canina en el Municipio de Ecatepec de Morelos, Estado de México. Antirrábico Municipal de Ecatepec. 1er. Encuentro Nacional de Laboratorios de Diagnóstico de Rabia. CENASA, Tecámac, Estado de México. Sept 26-30, 2005.
- 49) Jiménez JA. Campaña de la Rabia Parálítica Bovina: Acciones y situación. Campaña de Rabia Parálítica Bovina DGSA. 1er. Encuentro Nacional de

Laboratorios de Diagnóstico de Rabia. CENASA, Tecámac, Estado de México. Sept 26-30, 2005.

- 50) Amezcua, OI. Acciones de la campaña de rabia paralítica bovina en la región de la Huasteca Potosina (Hallazgo de murciélago hematófago albino, *Desmodus rotundus*) Comité de Fomento y Protección Pecuaria SLP. 1er. Encuentro Nacional de Laboratorios de Diagnóstico de Rabia. CENASA, Tecámac, Estado de México. Sept 26-30, 2005.
- 51) Domínguez, OJ. Comportamiento epidemiológico de la rabia en México AMMVEPE 2004; 12 (3): 68-72.
- 52) Reyes, C. P. El maíz y su cultivo. AGT Editor, S. A. México 1990, pp 460
- 53) Meslin FX, Fishbein D, Matter H. Rational and prospects for rabies elimination in developing countries. In Lyssaviruses Rupprecht CE, Dietzschold B, Koprowski (eds). Sprinder Verlang, Berlin. 1994, 1-26.
- 54) Dressen DW. A global review of rabies vaccines for human use. Vaccine 1997; 15 suppl; S2- S6.
- 55) Wasi C. Chaiprosithikul P, Thangcharoen P, Kosient P, Sirikawin S. Progress and achievement of rabies control in Thailand. Vaccine 1997; 15 suppl: S7- S11.
- 56) Wandeler, A.I. Control of wildlife rabies: Europe. In: Campbell J.B., Charlton, K. M. (Eds), Rabies. Kluwer, Academic Publishers, Boston, 1998, pp 365-380.
- 57) Wandeler, A.I. Oral immunization of wildlife in: Baer, G. M. (Ed), The natural history of rabies, second ed. CRC Press, Boca Raton 1991, pp 485-503.
- 58) Kieny MP, Lathe R, Drillien R, Spehner D, Sokory S, Schmitt D, Wiktor T, Koprowski H, Lococoq D. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. Nature 1984; 312: 163-166.
- 59) Artois M, Guitré I, Leblois H, Brochier B, Barrat J. Potential pathogenicity for rodents of vaccines intended for oral vaccination against rabies : a comparison. Vaccine 1992; 10: 524-528.
- 60) Lontai I. The current state of rabies prevention in Europe. Vaccine 1997; 15 suppl: S16-S19.
- 61) Yakobson BA, King RJ, David D, Sheichat N, Rotenderg D, Dveres N, Samina I, Zaharin Y, Perl S, Orgad U. Comparative efficacy of two vaccines in captive jackals (*canis aureus*). The 10<sup>th</sup> annual rabies in the Americas meeting. November 14-19, 1999 San Diego Ca, USA, 1999; 80.

- 62) Wang Y, Xiang Z, Pasquín S, Ertl HC. Effect of passive immunization of maternally transferred immunity on the antibody response to a genetic vaccine to rabies virus. *J virol* 1998; 72: 1790-1796.
- 63) Lodmell DL, Smith JS, Esposito JJ, Ewalt L. Cross protection of mice against a global spectrum of rabies virus variants. *J Virol* 1995; 69: 4957-4962.
- 64) Perrin P, Jacobs Y, Aguilar A, Loza-Rubio E, Jallet C, Desmézières E, Aubert M, Cliquet F, Tordo N. Immunization of dogs with DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine* 1999; 18: 479-486.
- 65) Weimersheimer JRE, Loza-Rubio E. Protección cruzada entre variantes moleculares del virus de la rabia y vacunas antirrábicas inactivadas de uso común en México, The 10th Annual Rabies Meeting. Nov 14-19; 1999. San Diego California USA.
- 66) Arellano SC, Sureau P, Batalla CD,. Evaluación de una vacuna antirrábica cepa ERA en bovinos. *Téc Pecu Méx* 1971; 18: 16-21.
- 67) Loza-Rubio E, Hernández BE. Obtención y evaluación de la antigenicidad de una vacuna antirrábica concentrada. *Téc Pecu Méx* 1995; 33: 87-91.
- 68) Rodríguez M. Plantas transgénicas: Métodos y aplicaciones de riesgos. Universidad de Panamá, Monografía para el seminario de biología molecular, Abril 2006.
- 69) McGarvey, P. B., J. Hammond, M.M. Dienelt, D. C. Hooper, Z. F. Fu, B. Dietzschold, H. Koprowski, and F. H. Michaels. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes,. *Bio/Technology* 1995, 13: 1484-1488.
- 70) Yusivov V, Modelska A, Stelewski K, Agadjanyan M, Weiner D, Hooper DC, Koprowski H. Antigens produced in plants by infection with chimeric plant viruses immunize against rabies virus and HIV-1. *proc Natl Acad Sci USA* 1997; 5784-5788.
- 71) Rojas AE. Tesis de Maestría “Expresión e Identificación de la Proteína G del Virus de la Rabia en Zanahoria. “ENCB” IPN. México, D. F. 2005.
- 72) Lerma SL. Caracterización de plantas de maíz obtenidas a partir de callos embriogénicos transformados con el gen de la proteína G del virus de la rabia. Marzo 2005; 80 pag.
- 73) Jiménez MJ. Transformación genética de callos embriogénicos de maíz (zea mays L) con el gen de la glicoproteína G del virus de la rabia. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias 2006. 98 paginas.

- 74) Monique Lafon. Immunology. Institut Pasteur, Unité de Neuro-immunologic Virale. Elsevier Science 2002 France. Pp351-369
- 75) Hill H. Comparison of cellular and humoral immune responses to rabies and Sindbis Virus in Mice. Ph.D. Thesis, Iowa State University, 1994.
- 76) Langridge, William H. R. Edible vaccines Scientific American. 2000, 283: 48-53
- 77) Roitt I. Fundamentos de Inmunología. 9 ed, Editorial Panamericana. 2000
- 78) Mestecky J., Moldoveanu, Elson C.O. Immune response versus mucosal tolerante to mucosally administered antigen. Vaccine 23. 2005. pp 1800-1803.
- 79) Arévalo JR, Huenumán JC, Vega TA. Seminario de plantas transgénicas. Universidad de Concepción, Facultad de Ingeniería Agrícola.
- 80) Center for Life Sciences and Department of Soiland Croop Sciences at Colorado State University, Agosto 29, 1999-2002
- 81) Instituto de Biotecnología (IBT-UNAM). Las plantas transgénicas y la agricultura mundial, Julio 2002.
- 82) Gálvez MA. Transgénicos y legislación. Revista ciencia y desarrollo, Marzo-Abril (175), 2004: 38-41
- 83) Padilla AJ. Bioseguridad hoy: ¿Que tan inocuos son los alimentos modificados genéticamente. Revista Ciencia y Desarrollo (175), 2004: 34-37.
- 84) Herrera EL. Plantas transgénicas aplicaciones y controversias. Revisa Ciencia y Desarrollo (175), 2004: 42-53.
- 85) Mason S. H, Warzecha H, Mor T, Arntzen J. Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. TRENDS In Molecular Medicine vol 8 N° 7; July 2002: 324-329.
- 86) Arntzen, Charles J. High-Tech Herbal Medicine: Plant-Based Vaccines. Nature Biotechnol 15: 221-221.
- 87) Hugh S. Mason and Charles J. Arntzen. Transgenic Plants as vaccine. Production Systems. Manipulating metabolism. TIBTECH, vol (13), sept 1995: 388-392.



- 88) Vandekerckhove, J.J., Van Damme M, Leemans J, M. Van Montagu, M. De Block, Vandewiele A, De Clercq J and Krebbers E. Encephalins produced in transgenic plants using modified 2S seed storage proteins. *Bio/Technology* 1989, 7: 929.
- 89) Hitta A, R. Cafferkey, and K. Bowdish. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 1989; 342:76.
- 90) Sijmons, P.C., B. M. M. Dekker, B. Schrammeijer, T. C. Verwoerd, P. J. M. Vanden Elzen, and Hoekema A. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/ Technology* 1990; 8: 217.
- 91) De Zoeten, G.A. J. R. Penswick, M.A. Horisberger, P. AHL, M. Schultze, and T. Hohn. The expression, localization, and effect of a human interferon in plants. *Virol* 1989; 172: 213.
- 92) Mason, H.S., Larn, D. M. K. and Amtzen, C. J. (1992) Expression of the hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1992: 89 11745-11749.
- 93) Arntzen; C. J., Mason; H. S., Shi, J., Haq, T. A., Estes, M. K., Clements, J. D. Production of candidate oral vaccine in edible tissues of transgenic plants. In: *Vaccines 94*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1994. 339, 344.
- 94) Haq, T.A., H. S. Mason, J. D. Clements, and C. J. Arntzen. Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants, *Science* 1995; 268: 714.
- 95) Mor TS, Gómez-Lim MA, Palmer KE. Perspective: edible vaccines-a concept of coming age. *Trends in Microbiol* 1998; 6: 449-453.
- 96) Walmsley AM, Arntzen JC. Plants for delivery of edible vaccines. *Elsevier Science* 11; 2000; 126-129.
- 97) Mason, Hugh S. Plant-Based Vaccines: Expression and Oral immunogenicity. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 38; 2002: 237-240.
- 98) Castañeda, FN. *El maíz*. Ed Limusa, ed 4º; México 1990: 76.
- 99) Flecknell P. *Anestesia de animales de laboratorio. Introducción práctica para investigadores y técnicas*. Acribia, 1998.
- 100) NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción cuidado y uso de los animales de laboratorio. "Diario Oficial de la Federación". Méx. D, F; 22 de Agosto 2001.

- 101) Vanda-Cantón B. La experimentación biomédica en animales en los códigos bioéticos; *Laborat-acta* 15; 2: 2003.
- 102) Federación de Colegios y Asociaciones de Médicos Veterinarios Zootecnistas de México. Código de ética profesional del Médico Veterinario Zootecnista en México; 1999.
- 103) NOM-035-ZOO-1996. Requisitos mínimos para las vacunas, antígenos y reactivos empleados para la prevención y control de la rabia en las especies domésticas”*Diario Oficial de la Federación. Seg. Secc, Méx. D, F; 26 de junio de 1996*”. 1-10.
- 104) Smith JS, Yager PA, Baer GM. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies virus neutralizing antibody. In: Meslin FX, Kaplan MM, Koprowski H, eds. *Laboratory techniques in rabies*. 4 ed. Geneva, Switzerland, WHO. 1996. 181,192.
- 105) Murrieta TGF. Evaluación de la respuesta humoral contra el virus de la rabia, en personal que labora en centros de alto riesgo. Tesis de Licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. 2005 124 pág.
- 106) Lauterslager TGM, Florack DEA, Van der Wal TJ, Molthoff JW, Langeveld JPM, Bosh D, Boersma WJA, Th Hilgers LA. Oral immunization of naïve and primed animals with transgenic potato tubers expressing LT-B. *Vaccine* 19; 2001: 2749-2755.
- 107) Mason HS, Haq TA, Clements JD, Arntzen CJ. Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a syntetic LT-B gene. *Vaccine* 16: 1336-1343.
- 108) Valdés R, Gómez L, Padilla S, Brito J, Reyes B, Álvarez T, Mendoza O, Herrera O, Ferro W, Pujol M, Leal V., Linares M, Hevia Y, García C, M L, García o, Sánchez R, Acosta A, Geada D, Páez R, Luis Vega J, Borro. Large-scale purification antibody directed against hepatitis B surface antigen from transgenic tobacco plants. *Biochem Biophys Res Common*; 2003: Aug 15; 308 (1): 94-100.
- 109) Kapusta J, Modelska A, Figlerowicz M, Pniewski T, Letellier M, Lisowa O, Yusibov V, Koprowski H, Plucienniczak A, Legocki AB. A plant-derived edible vaccine against hepatitis B virus. *Faseb J*13; 1999: 1796-1799.
- 110) Gómez N, Wigdorovitz A, Castañon S, Gil F, Ordas R, Borca MV, Escribano JM. Oral immunogenicity of the plant derived spike protein from swine-transmissible gastroenteritis coronavirus. *Arch Virol*. 2000; 145 (8): 1725-32.

- 111) Guerrero-Andrade O, Loza-Rubio E, Olivera-Flores M, Fehervari-Bones T, Gómez-Lim MA, Expression of the Newcastle Disease Virus fusion protein in transgenic and immunological studies. *Transgenic Res* 2006; 15: 255-463
- 112) Verdonk F, Snoeck V, Gutteres BM, Cox E. Cholera toxin improves the F4 (K88)-specific immune response following oral immunization of pigs with recombinant FaeG. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005 Jan 110; 103 (1-2): 21-9.
- 113) Shuttleworth G, Eckery DC, Awram P. Oral and intraperitoneal immunization with rotavirus 2/6 virus like particles stimulates a systemic and mucosal immune response in mice. *Arch Virol.* 2005 Feb; 150 (2): 341-9.
- 114) Muller PC, Fack F, Damien B, Fabbienne B. Immunogenic measles antigens expressed in plants: role as edible vaccine for adults. *Vaccine* 21; 2003: 816-819.
- 115) Huand Z, Dry I, Webster D, Strugnell R, Wesseling S, Plant-derived measles virus hemagglutinin protein induces neutralizing antibodies in mice. *Vaccine* 2001; 19: 2163-71.
- 116) Freytag LC, Clements JD. Mucosal adjuvant. *Vaccine* 23, 2005: 1804-1813.
- 117) Rossi L, Balde A, Dell Orto V and Fogher C. Antigenic recombinant proteins expressed in tobacco seeds as a model for edible vaccines against swine oedema. *Veterinary Research Communications*, 27 suppl.1; 2003: 659-661.
- 118) Gil F, Brun A, Wigdorovitz A, Catalá R, Martínez-Torrecuadrada JL, Casal I, Salinas J, Borca MV, Escribano JM. High-yield expression of a viral peptide vaccine in transgenic plant, 2005.
- 119) Faye L, Boulaflous A, Benchabane M, Gomord M, Michaud D. Protein modifications in the plant secretory pathway: current status and practical implications in the molecular pharming. *Vaccine* 23; 2005: 1170-1178.