



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA  
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA  
GENÉTICA MOLECULAR**

**Evaluación del Baculovirus como vehículo de inmunización  
para el virus de la rabia.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

**Aguilar Huerta Eduardo**

Comité Tutoral:

Rogelio Alejandro Alonso Morales

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Rosa Elena Sarmiento Silva

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

José Álvaro Aguilar Setién

Posgrado de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud  
Animal

MÉXICO D.F. MARZO 2015



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.

## **DEDICATORIAS**

A mi mamá Elvira Huerta Salazar y a mi papá Valerio Aguilar Pérez por su comprensión, amor y su apoyo incondicional, sin ellos nunca hubiera alcanzado este logro.

A mis hermanos Gabriela, Adriana, Alejandro y mis sobrinas Valeria y Fernand por aguantarme y estar conmigo en las buenas y sobre todo en las malas cuando más los necesitaba.

A mis amigos y compañeros de laboratorio: Luz Selene González, Mario Palma, Pablo Pintor, Jorge Vázquez, Vianey Ramírez, Alex Valdez, Zoalli Uribe, Lizbeth Toiber, Jessica Molina, Carolina Durán, Benedict López, Adriana Martínez y Mario Espinoza.

Finalmente quiero agradecer a todas aquellas personas que de una u otra manera me ayudaron durante mi estancia en el posgrado y durante la elaboración de esta tesis.

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, y al por permitirme cursar mis estudios de maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico durante mis estudios de posgrado.

A la DGAPA por el apoyo recibido a través del proyecto PAPIIT IN207710.

Al Dr. Rogelio A. Alonso Morales por permitirme ser parte de este proyecto tan interesante y brindarme su conocimiento y confianza.

A la Bióloga Amanda Gayosso Vázquez por la paciencia, conocimiento y apoyo constante durante la elaboración de este trabajo.

Al MVZ Raymundo Iturbe Ramírez, por toda la ayuda brindada en las pruebas de desafío y manejo del virus de la rabia.

Dra. Rosa Elena Sarmiento Silva por todo su conocimiento y orientación tanto académica como personal.

A mi jurado, la Dra. Susana Mendoza Elvira, el Dr. Humberto Ramírez Mendoza, Dra. Elizabeth Loza Rubio y al Dr. Alfredo Sahagún Ruíz; por sus comentarios que enriquecieron la tesis.

## ÍNDICE

Carátula .....	1
ÍNDICE .....	4
Índice de Figuras .....	7
Índice de Cuadros .....	8
RESUMEN .....	9
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>10</b>
1.1 Marco teórico .....	11
1.1.1. Baculovirus .....	11
1.1.2. Sistema de Expresión en Baculovirus .....	13
1.1.3. El baculovirus como vehículo de inmunización .....	14
1.1.4. Virus de la rabia .....	15
1.1.5. La glicoproteína G .....	18
1.1.6. Vacunas antirrábicas .....	19
1.1.7. Vacunas subunitarias .....	20
<b>II. OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
2.1 Objetivo general .....	23
2.2 Objetivos específicos .....	23
<b>III. Material y Métodos .....</b>	<b>26</b>
3.1 Amplificación y modificación del gen que codifica para gG del virus de la rabia .....	26
3.1.1. Construcción gG con cola de Histidinas (gGHist) .....	27
3.1.2. Construcción gG con P2 y cola de Histidinas (gGP2) .....	28
3.1.3. Construcción gG con P30 y cola de histidinas (gGP30) .....	29
3.2 Purificación del producto amplificado .....	30
3.3 Clonación en el Vector PGEM-T .....	31
3.4 Técnica de Mini preparación de ADN Plasmídico .....	32
3.5 Clonación en Vector PFAST-BAC .....	33
3.6 Transposición en células competentes DH10BAC .....	35
3.7 Transfección de las células SF9 .....	36
3.8 Propagación de Baculovirus Recombinantes .....	37

3.9	Técnica de ELISA Indirecta .....	38
3.10	Técnica de Bradford.....	39
3.11	Técnica de PCR Cuantitativa (qPCR).....	40
3.12	Titulación del virus de la rabia.....	41
3.13	Estandarización de la Dosis Letales al 50% y Vacuna de referencia.....	42
3.13.1.	Inmunización de los Ratones. ....	42
3.13.2.	Desafío de los ratones.....	43
3.14	Desafío de ratones inmunizados con vacunas recombinantes. ....	44
<b>IV.</b>	<b>Resultados</b> .....	<b>46</b>
4.1.1.	Amplificación con el primer juego de iniciadores. ....	46
4.1.2.	Amplificación de PCR anidado con el segundo juego de iniciadores.....	47
4.1.3.	Purificación del producto amplificado. ....	48
4.2	Clonación en el Vector PGEM-T.....	48
4.2.1.	Selección de clonas con el inserto .....	49
4.2.2.	Mini Preparación de ADN de plásmidos.....	49
4.2.3.	Digestión con enzima BamH1 .....	50
4.3	Clonación en Vector PFAST-BAC .....	51
4.3.1.	Clonación en Vector pFAST-BAC.....	51
4.3.2.	Mini Preparación de ADN de plásmidos.....	52
4.4	Transposición en células competentes DH10BAC .....	52
4.4.1.	Selección de Clonas Correctamente Transpuestas .....	52
4.4.2.	Mini Preparación de ADN de Bácmidos .....	53
4.4.3.	PCR de Bácmidos Seleccionados.....	54
4.4.4.	Transfección en células de insecto SF9.....	55
4.5	Evaluación de la expresión de antígenos recombinantes y número de copias virales.....	55
4.5.1.	Evaluación de Transfección. ....	55
4.5.2.	Evaluación Pase ciego Post-transfección .....	56
4.5.3.	Evaluación de la producción de baculovirus recombinantes dependiendo de la multiplicidad de infección (MOI).....	57
4.5.4.	Evaluación de Infecciones a diferentes MOIs.....	58

4.6	Evaluación de las vacunas recombinantes en pruebas de desafío en ratones. . .	60
4.6.1.	Titulación del virus de la rabia.....	60
4.6.3.	Primer experimento de desafío.....	63
4.6.3.1.	Evaluación de antígenos primer desafío .....	63
4.6.3.2.	Evaluación de la capacidad inmuno-protectora en primera prueba de desafío .....	66
4.6.3.3.	Evaluación de sueros de ratones primer desafío.....	67
4.6.4.	Segundo experimento de desafío.....	69
4.6.4.1.	Evaluación de antígenos segunda desafío .....	69
4.6.4.2.	Evaluación de la capacidad inmuno-protectora segunda prueba de desafío. ....	71
4.6.4.3.	Evaluación de sueros de ratones segundo desafío.....	72
4.6.5.	Tercer experimento de desafío .....	74
4.6.5.1.	Evaluación de antígenos tercer experimento de desafío.....	74
4.6.5.2.	Evaluación de la capacidad inmuno-protectora tercer prueba de desafío. 77	
4.6.5.3.	Evaluación de los sueros de ratones sobrevivientes tercer desafío. ....	79
<b>V.</b>	<b>Discusión</b> .....	81
<b>VI.</b>	<b>Conclusiones</b> .....	88
<b>VII.</b>	<b>Bibliografía</b> .....	89
<b>VIII.</b>	<b>Anexos</b> .....	102
	<b>Anexo 1. Protocolo de inmunización segundo experimento de desafío. ....</b>	102
	<b>Anexo 2. Protocolo de inmunización tercer experimento de desafío.....</b>	104

## Índice de Figuras

Figura 1. Sitios de alineación de los iniciadores para la construcción de la gG con cola de histidinas (gGHist).....	27
Figura 2. Sitios de alineación de los iniciadores para la construcción de la gG con cola el epítopo P2 (gGP2).....	29
Figura3. Sitios de alineación de los iniciadores para la construcción de la gG con cola el epítopo P30 (gGP30).....	30
Figura 4. Amplificación de la gG de rabia con el primer juego de primer .....	47
Figura 5. Amplificación de gen gG del virus de la rabia con el segundo juego de iniciadores .....	47
Figura 6. Recuperación de los fragmentos purificados.....	48
Figura7.Selección de clonas recombinantes en el vector T.....	49
Figura8. Plásmidos purificados de las clonas seleccionadas en vector T .....	50
Figura9 Digestión de los plásmidos purificados con la enzima BamHI .....	50
Figura 10. Selección de clonas con el inserto en el vector pFast-Bac.....	51
Figura 11.Plásmidos purificados de las clonas seleccionadas en vector pFast-Bac.....	52
Figura 12. Selección de bácmidosrecombinantes correctamente transpuestos.....	53
Figura 13Bácmidos purificados de las clonas seleccionadas.....	54
Figura 14 PCR de los bácmidos purificados seleccionados .....	54
Figura 15. Reactividad antigénica de la transfección de los baculovirus.....	56
Figura 16.Evaluación de la reactividad antigénica y número de copias virales de los baculovirusobtenidos en el pase ciego.....	57
Figura 17.Reactividad antigénica y número copias virales de los baculovirus con diferentes MOI .....	59
Figura18. Estandarización de dosis Letales 50% y vacuna de referencia.....	62
Figura 19. Reactividad antigénica de los inmunógenos1 <sup>er</sup> desafío.....	64
Figura 20.Reactividad de sueros de ratones sobrevivientes con antígeno gG 1 <sup>er</sup> desafío	67
Figura 21.Reactividad de sueros de ratones sobrevivientes con antígeno M 1 <sup>er</sup> desafío .	68
Figura 22. Reactividad antigénica de los inmunógenos 2 <sup>o</sup> desafío.....	70
Figura 23. Reactividad de sueros de ratones sobrevivientes con antígeno gG 2 <sup>o</sup> desafío	73
Figura 24. Reactividad de sueros de ratones sobrevivientes con antígeno M de influenza2 <sup>o</sup> desafío .....	73
Figura 25. Reactividad antigénica de los inmunógenos 3 <sup>er</sup> desafío.....	75
Figura 26. Ratones sobrevivientes al 3 <sup>er</sup> experimento de desafío .....	78
Figura 27. Reactividad de sueros de ratones sobrevivientes con antígeno gG 3 <sup>er</sup> desafío	79
Figura 28. Reactividad de sueros de ratones sobrevivientes con antígeno M 3 <sup>er</sup> desafío.	80



## Índice de Cuadros

Cuadro 1 Iniciadores empleados para la construcción de la gG con cola de histidinas (gGHist).....	27
Cuadro 2. Iniciadores empleados para la construcción de la gG con el epítipo P2 (gGP2) .....	28
Cuadro 3. Iniciadores empleados para la construcción de la gG con el epítipo P30 (gGP30) .....	30
Cuadro 4. Iniciadores empleados para la QPCR. pb: pares de bases .....	40
Cuadro 5. Componentes y concentraciones de la mezcla de reacción. ....	41
Cuadro 6. Temperaturas y número de ciclos para la QPCR.....	41
Cuadro 7. Numero de ratones para la estandarización de Dosis Letales 50%(DL50%) y vacuna de referencia. ....	43
Cuadro 8. Esquema de inmunización experimento de desafío .....	45
Cuadro 9.Determinación de las infecciones controladas.....	58
Cuadro 10. Calculos de titulación viral por Reed y Muench.....	60
Cuadro 11 Cronograma de ratones sobrevivientes a la estandarización de las DL50% y Vacuna de referencia. ....	62
Cuadro 12. Concentración de proteína total 1 <sup>er</sup> desafío .....	64
Cuadro 13. Número de copias virales 1 <sup>er</sup> desafío .....	65
Cuadro 14 Cronograma de ratones sobrevivientes al 1 <sup>er</sup> experimento de desafío .....	66
Cuadro 15. Concentración de proteína total 2 <sup>o</sup> desafío .....	70
Cuadro 16. Número de copias virales 2 <sup>o</sup> desafío .....	71
Cuadro 17. Cronograma de ratones sobrevivientes al 2 <sup>o</sup> experimento de desafío .....	72
Cuadro 18. Concentración de proteína total 3 <sup>er</sup> desafío .....	75
Cuadro 19. Número de copias virales 3 <sup>er</sup> desafío .....	76
Cuadro 20. Cronograma de ratones sobrevivientes al 3 <sup>er</sup> experimento de desafío.....	77
Cuadro 21. Esquema de inmunización 2 <sup>o</sup> experimento de desafío .....	103
Cuadro 22 Esquema de inmunización 3 <sup>er</sup> experimento de desafío.....	105

## RESUMEN

Los baculovirus se han utilizado como un eficiente vector de expresión de proteínas recombinantes por su alta producción, la capacidad de realizar modificaciones postrasduccionales similares a las realizadas por células de mamíferos y la rápida generación de baculovirus recombinantes. La utilización del baculovirus como un vehículo de inmunización de antígenos subunitarios se ha demostrado para diferentes virus incluso el de la rabia. El virus de la rabia sigue siendo una amenaza para la salud pública, tan sólo en México se han reportado 33 casos de rabia en humanos de 1996-2009. La glicoproteína G del virus de la rabia ha demostrado ser un agente capaz de inducir una respuesta inmune protectora, por lo cual se ha empleado para generar vacunas subunitarias. Una desventaja de estas vacunas es su limitado nivel de inmunogenicidad, generalmente se tienen que emplear dosis altas del antígeno o en combinación con inmunoestimulantes. En el presente trabajo se evaluó el baculovirus como vector de inmunización, utilizando como modelo la glicoproteína G del virus rabia a la cual se le adicionaron los epítomos inmunoestimulantes P2 y P30 de la toxina tetánica. Se logró amplificar y modificar el gen que codifica para la gG por PCR punto final, obteniendo tres construcciones gGHist, gGP2 y gGP30, los cuales fueron clonados en el sistema de expresión de baculovirus BAC to BAC® para su propagación. La capacidad inmunoprotectora de los baculovirus recombinantes se evaluó en tres experimentos de inmunización/desafío, confirmando previamente la reactividad, concentración de proteína y número de copias virales de los baculovirus. Los resultados obtenidos en los experimentos de inmunización/desafío mostraron que no fueron inmunoprotectoras. Es importante evaluar los parámetros implicados en la producción de los antígenos recombinantes para identificar los factores que son importantes para inducir inmunidad protectora.

**Palabras clave:** Baculovirus, rabia, glicoproteína G, vacuna subunitaria, proteínas recombinantes

## SUMMARY

Baculoviruses are used as an efficient vector for the expression of recombinant proteins because of its high production, the ability to perform post translational modifications similar to those performed by mammalian cells and the rapid generation of recombinant baculoviruses. The use of baculovirus as an immunization vehicle for subunit antigens has been shown for various viruses including rabies. The rabies virus remains a threat to public health, only Mexico has reported 33 cases of rabies in human between 1996-2009. The G glycoprotein of rabies virus is capable of inducing a protective immune response, whereby it has been used to generate subunit vaccines. One disadvantage of these vaccines is their limited level of immunogenicity, most of them employ high doses of antigen or in combination with immunostimulants. In this paper the baculovirus was evaluated as an immunization vector, using the G glycoprotein of rabies virus as a model, to which were added P2 and P30 immunostimulatory epitopes of tetanus toxin. The gG encoding gene was amplified and modified by endpoint PCR, obtaining three constructs: gGHist, gGP2 and gGP30, which were cloned into the baculovirus expression system Bac to BAC® for their propagation. The immunoprotective proficiency of the recombinant baculoviruses was evaluated in three immunization/challenge experiments, previously confirming the reactivity and protein concentration as well as the number of baculoviruses copies. The results obtained in the immunization/challenge experiments showed that those constructions were not immunoprotective. It is important to evaluate the parameters involved in the production of recombinant antigens to identify factors that are important for inducing protective immunity.

Keywords: Baculovirus, Rabies, G glycoprotein, subunit vaccine, recombinant proteins

# I. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Marco teórico

### 1.1.1. Baculovirus

Los baculovirus son vectores muy eficientes para la expresión de proteínas recombinantes, así como antígenos útiles para el desarrollo de vacunas recombinantes (Luckow. & Summers.1988). La era moderna de la investigación en baculovirus se extiende desde los años 80 y ha tenido rápidos y notables avances. Inicialmente, los baculovirus se estudiaron principalmente para aplicaciones agrícolas que implican el control de plagas (Summers2006).

En un inicio, se hizo referencia a la estructura única del baculovirus y su proceso natural de infección, su biología y la base molecular de la ruta de la infección viral. Esto condujo a descubrimientos fundamentales sobre la estructura de baculovirus, la estructura y función de las proteínas codificadas por el virus, y de la naturaleza de la especificidad de virus-huésped. Para esa época el desarrollo fundamental de las tecnologías de ADN recombinante y la manipulación genética ya había llegado, por lo que se aplicaron esos descubrimientos e innovaciones a los baculovirus (Summers2006).

La familia *Baculoviridae* cuenta con más de 600 especies de virus, con genoma de ADN de doble cadena circular que varía en el tamaño de 80 a 180kb, son envueltos y sólo son patógenos para artrópodos (Federici 1985). Los baculovirus se dividen taxonómicamente en dos grupos generales los Nucleopolyendrovirus

(NPV) y Granulovirus (GV). Los virus GV están envueltos en una matriz proteica de granulina y sólo tiene una nucleocápside por envoltura a diferencia de los NPV los cuales están envueltos en una matriz proteica de poliedrina y se contiene más de una nucleocápside por envoltura. (Blissard et al. 2000; Carstens, 2009; Rohrmann, 1999; Winstanley y O'Reilly D, 1999).

Estudios filogenéticos indican que el género NPV puede estar dividido en dos subgrupos, el subgrupo I que contiene en su superficie la Glicoproteína GP64 a la cual pertenece la especie *Autographa californica nucleopolyhedrovirus* (ACMNPV) y el subgrupo II con proteína F o de fusión (Pearson; Groten; y Rohrmann. 2000). Estos virus están clasificados en el Grupo I de Baltimore por ser su genoma de ADN de doble cadena (Chen et al. 2011).

El virus AcMNPV fue descrito por primera vez en los años 70s y fue aislado de su hospedero el lepidóptero *Autographa californica* del cual toma su nombre (Winstanley y O'Reilly D, 1999), es el primer baculovirus secuenciado completamente, tiene un genoma circular cerrado de 134kpb, y alrededor de 154 marcos abiertos de lectura (ORFs) (Ayres et al. 1994). Su cápside mide 21nm de ancho por 260nm de largo, y su principal proteína es la VP39 o Poliedrina (Winstanley y O'Reilly D, 1999).

En 1983 Smith describe un método para introducir mutaciones en sitios específicos del genoma del AcMNPV utilizando el gen que codifica para la poliedrina,(Smith, Fraser, y Summers. 1983), esto aunado a la implantación de la

técnica para transfectar ADN purificado de baculovirus en células de insecto, son importantes desarrollos que conducen a una nueva era en la investigación de baculovirus incluyendo descubrimientos en los genes de baculovirus, la función de genes, procesos regulatorios, la replicación del ADN y el desarrollo de baculovirus como un sistema eficiente expresión eucariótica (Summers. 2006).

#### 1.1.2. Sistema de Expresión en Baculovirus

El sistema de expresión de baculovirus es un método bien establecido para la producción de proteínas recombinantes, con la gran ventaja sobre las proteínas expresadas en *E. coli* sufren modificaciones post-traduccionales, por ejemplo, fosforilación, glicosilación y plegamiento (Harrison; y Jarvis. 2006). Este sistema de expresión es muy adecuado para la producción de proteínas eucarióticas y para muchas aplicaciones, incluyendo la producción de productos farmacéuticos, pesticidas, vacunas y más recientemente de vectores de terapia génica (Kost, Condreay, & Jarvis. 2005). Es importante destacar que los baculovirus no se replican en otras células eucariotas, además de las células de insectos, por lo tanto, la expresión en células de insectos en el laboratorio no requiere medidas especiales de bioseguridad (Murphy *et al.* 2004).

Este sistema de expresión aprovecha las propiedades de transposición específicas del sitio del transposón Tn7 para simplificar y mejorar el proceso de generación de ADN recombinante en báculo (genoma de baculovirus que lleva orígenes independientes para la replicación tanto en bacterias como en células de insecto) (Luckow *et al.* 1993). Este sistema puede ser modificado para investigar

cualquier gen de interés mediante la sustitución del gen de la poliedrina (Datsenko, & Wanner. 2000).

Este sistema permite la presentación de grandes proteínas complejas en la superficie de las partículas de baculovirus en su conformación nativa funcional, lo que resulta en la respuesta inmune superior cuando se utilizan como inmunógenos (Peralta *et al.* 2007).

### 1.1.3. El baculovirus como vehículo de inmunización.

La viabilidad de la utilización del baculovirus como un vehículo de vacunación fue demostrada por primera vez por la inoculación de ratones con un baculovirus que expresa la glicoproteína B del virus de la pseudorrabia provocando una respuesta humoral dirigida contra esta glicoproteína viral (Aoki *et al.* 1999). Más recientemente, se probó la respuesta inmune en ratones tras la vacunación con un vector de baculovirus que expresa a la hemaglutinina (HA) del virus de influenza H1N1 (Abe *et al.* 2003). Por otra parte, los baculovirus que expresan glicoproteína E2 del virus de la hepatitis C y el antígeno carcinoembrionario, provocan respuestas de células T específicas de antígeno (Facciabene, Aurisicchio, & Monica. 2004). Del mismo modo, por vía subcutánea (SC) e intraperitoneal (IP) se inmunizaron ratones con un baculovirus que expresa los antígenos del coronavirus del síndrome respiratorio agudo por (SARS-CoV) induciendo una respuesta inmune humoral e inmunidad celular T cooperadora. También se han inducido altos niveles de respuesta humoral y celular utilizando un baculovirus que contiene

la proteína del circumsporozoito de *Plasmodium berghei* / *falciparum* (Strauss *et al.* 2007).

Las ventajas del uso del baculovirus como vector de inmunización son la facilidad de manipulación genética, la obtención de altos títulos virales, la facilidad de escalamiento industrial, capacidad de clonación de segmentos grandes de ADN, la ausencia de replicación en células de mamífero, y la falta de toxicidad en células de mamíferos. Además, los genes virales se transcriben a partir de promotores que, si bien son muy activos en células de insecto, son transcripcionalmente silencioso en células de mamífero. Esta última característica aumenta la probabilidad de que la respuesta inmune no se dirija contra productos del baculovirus (Sussman *et al.*1988).

Un buen modelo biológico de evaluación de la capacidad de inmunización para vacunas experimentales es el virus de la rabia, por la característica de ser un virus mortal, permitiendo evaluar la protección *in vivo* de las vacunas. De forma que en los individuos inmunizados y desafiados no es necesario evaluar la propagación viral en órganos blancos, ni efectuar el aislamiento viral.

#### 1.1.4. Virus de la rabia.

La rabia sigue siendo una amenaza para la salud pública en todo el mundo, ya que causa una encefalomiелitis casi invariablemente fatal. Aunque las vacunas disponibles son eficaces, la rabia sigue causando más de 55 000 muertes de seres humanos cada año en todo el mundo, la mayor parte de ellos en países en



desarrollo de Asia y África, y está presente en más de 150 países (World Meath Organization, 2005).

En México fueron reportados aproximadamente 3,600 casos de rabia humana entre 1939 y 2003, y más del 90% de ellos estaban asociados con la transmisión del virus por los perros. Los esfuerzos para controlar la rabia canina disminuyeron drásticamente el número de casos de rabia humana, de un promedio de 70 casos por año durante el período 1939-1989 a un total de 320 casos durante el intervalo 1990-2003 (Belotto *et al.* 2005).

Después del inicio de la campaña de Eliminación de la Rabia Canina Urbana de las Américas, se inició en México (1990) una campaña masiva de vacunación canina. Entre 1989-1990 los perros y gatos representaron más del 94 % de los casos de rabia en México (Uhaa *et al.* 1992). Durante 2009, más de 17 millones de perros fueron vacunados en este país, en comparación con sólo 7 millones en 1990 (Lucas *et al.* 2007). Aunque la incidencia de la rabia en los animales disminuyó en correlación directa con el número de perros vacunados, se documentaron 7 casos de rabia en humanos asociados con los perros durante 1996-2009. Mientras que hubo 26 casos de rabia humana relacionados con exposición a fauna silvestre en el mismo período. (CENAVECE2011;Dominguez*etal.*1998), recientemente la rabia en fauna silvestre ha sido de mayor importancia en América del Norte. En los Estados Unidos, se han reportado más casos en animales salvajes que los domésticos, ya que la rabia en los perros está casi eliminada como resultado de los programas de vacunación

de perros y el control de perros callejeros. En México y América Latina en general, rara vez se denuncian casos de rabia en animales de fauna silvestres terrestre (Krebs *et al.*1997).

El virus de la rabia es un agente infeccioso neurotrópico, de transmisión directa con presentación nerviosa que puede afectar a los mamíferos (Meslin *et al.* 1996). La enfermedad puede adoptar dos formas la rabiosa y la forma parálitica. La forma Rabiosa se caracteriza por tener signos de hiperactividad, excitación, e hidrofobia; la muerte se produce a los pocos días por paro cardiorrespiratorio. La forma parálitica tiene un curso más prolongado, los músculos se van paralizando gradualmente, empezando por los más cercanos a la mordedura o arañazo, el paciente va entrando en coma lentamente, y acaba por fallecer (Bruner y Gillespie 1973). A menudo la forma parálitica no se diagnostica correctamente, lo cual contribuye a la subnotificación de la enfermedad.

Por ser un virus generalmente mortal para mamíferos, se decidió emplearlo como un sistema todo o nada para la evaluación de la capacidad inmuno-protectora de los baculovirus recombinantes, sin la necesidad de análisis posteriores.

El virus de la rabia es un virus prototípico del orden Mononegavirales, que agrupa a los virus de ARN de cadena negativa no segmentado (Tordo *et al.* 1986; Wunner, 2007), Familia *Rhabdoviridae*, que son virus que presentan una forma alargada parecida a una bala, el Género *Lyssavirus*, que son virus que sólo infectan a vertebrados; Especie *Rhabdovirus* (Conzelmann *et al.* 1990). Este virus tiene un

genoma ARN de una cadena de aproximadamente 12kb, el cual se empaqueta en un virión en forma de bala, envuelto de aproximadamente 250nm de longitud y 70nm de ancho. Su genoma está conformado por una cadena líder de aproximadamente 50 nucleótidos, seguida por cinco genes que codifican para cinco proteínas que son en orden de 3' a 5', la proteína N o núcleo proteína, Proteína P o fosfoproteína, Proteína M o proteína de matriz, la proteína G o glicoproteína y la proteína L o polimerasa. Las cinco son proteínas estructurales del virión y son esenciales para la replicación y propagación del virus (Fujii *et al.* 1994).

El ARN viral está envuelto por la nucleoproteína que es altamente conservada y forma un complejo de ribonucleoproteína (RNP). El RNP sirve como molde para la polimerasa viral que se compone de una subunidad catalítica L y el cofactor de la polimerasa de P. La síntesis de ARN, así como el ciclo de replicación, tiene lugar en el citoplasma (Brzózka, 2006). La proteína M, junto con la glicoproteína G (gG), son esenciales para la gemación de partículas de virus. La glicoproteína es el principal factor de virulencia del virus de la rabia (Morimoto *et al.* 2000). Para el virus de la rabia y la mayoría de otros virus con envoltura, las espículas de la proteína G son antígenos responsables de la estimulación de anticuerpos neutralizantes del virus (Wiktor *et al.* 1973).

#### 1.1.5. La glicoproteína G

La gG (65-80 kDa) se encuentra anclada a la membrana lipídica del virus, constituye las espículas salientes y es la más inmunogénica. Esta proteína

presenta cuatro dominios que de extremo amino a carboxilo son: el péptido señal con una longitud de 19 aminoácidos (aa); el ectodominio de 439 aa que constituye la parte externa; el dominio transmembranal de 21 aa que es hidrofóbico y permite el anclaje a la membrana y el dominio intracitoplasmático de 45 aa que es hidrofílico. Se han reconocido dos sitios antigénicos principales: el sitio antigénico II, que es discontinuo y está formado por los segmentos de los residuos de aminoácidos 34-42 y 198-200; y el sitio antigénico III, que es continuo y se localiza entre los aminoácidos 330 y 338 (Morimoto *et al.* 2001).

La glicoproteína G es la proteína más inmunogénica y está asociada con la producción de anticuerpos neutralizantes específicos (Morimoto *et al.* 2001). Vacunas experimentales basadas en proteína G, tales como las vacunas de ADN, vacunas de proteínas recombinantes, vacunas de virus vivos con vector de virus de la pseudorrabia (recombinantes), y vacunas subunitarias se han desarrollado y probado contra la infección de la rabia (Perrin *et al.* 1999).

#### 1.1.6. Vacunas antirrábicas

Las vacunas son recursos exitosos para el control de enfermedades infecciosas. Tradicionalmente las más empleadas son las vacunas inactivas y las atenuadas. Las primeras consisten simplemente en emplear los patógenos que han sido inactivados; las segundas emplean variantes de los patógenos que se han seleccionado o modificado para que pierdan su capacidad infecciosa. Aunque estas vacunas son las más ampliamente usadas llegan a tener algunos inconvenientes. Las vacunas con virus vivos atenuados, pueden ser

inmunosupresores o causar la enfermedad si no se atenúa lo suficiente. Alternativamente, si están demasiado atenuados, su capacidad de generar inmunidad es limitada. Por otro lado, las vacunas muertas son a menudo incapaces de generar los niveles de protección de la inmunidad, por razones de carga antigénica o pérdida de epítomos importantes durante la inactivación e inmunizaciones repetidas son necesarias (Rogan y Babiuk. 2005).

Los avances en conocimiento de la biología molecular de los patógenos y de la respuesta inmune ha permitido el desarrollo de vacunas de nueva generación entre las que se encuentran las vacunas subunitarias.

#### 1.1.7. Vacunas subunitarias.

Las vacunas subunitarias consisten en péptidos, proteínas o polisacáridos que contienen determinantes antigénicos (epítomos) protectores. La composición de estas vacunas es claramente definida y se reducen los riesgos de infección y efectos secundarios (Wunner *et al.*1983; Fekadu *et al.* 1992).

Los primeros intentos de utilización de las vacunas de subunidades se hicieron mediante el uso de proteínas recombinantes expresadas en bacterias (Coll 1995). Así el cDNA clonado que codifica para la gG del virus de la rabia, cuando se expresa en bacterias no genera un antígeno capaz de producir anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia. El fracaso de la protección por el gG producido en bacterias, en comparación con la gG que se producen en vectores

eucarióticos, es probablemente debido a la incapacidad de las bacterias para glicosilar y procesar correctamente la estructura de la proteína (Coll 1995).

La producción de anticuerpos después de la inmunización con vacunas subunitarias ó péptidos, requiere que estos contengan no sólo los sitios apropiados de reconocimiento de anticuerpos (epítopes de células B), sino también sitios capaces de estimular células T-cooperadoras (Th) (Wunner *et al.*1983; Fekadu *et al.* 1992).

Generalmente, la presentación de péptidos antigénicos a través del complejo principal de histocompatibilidad tipo I (MHC I) sólo ocurre cuando las proteínas son sintetizadas y procesadas intracelularmente, de forma que las vacunas basadas en proteínas subunitarias generalmente no llegan a inducir respuestas inmunes celulares (Wunner *et al.*1983).

Las vacunas subunitarias que incorporan elementos inmunoestimulantes pueden inducir respuestas celulares y humorales por medio de reconocimiento asociativo, un proceso por el cual un epítrope dominante en una proteína de fusión aumenta la respuesta de otros epítopos que por sí solós tienen baja inmunogenicidad (Gerloni *et al.* 2000). Dos de éstos elementos estimulantes son los péptidos P2 y P30 de la toxina tetánica (Panina-Bordignon *et al.* 1989; Valmori *et al.* 1992), los cuales no son tóxicos, pero son altamente inmunogénicos para las especies animales y proporcionan una respuesta fuerte Th asociada a una respuesta inmune específica. Los epítopos T en los péptidos P2 y P30, identificados como

epítopos universales T, corresponden a los amino ácidos 830-843 y 947-957, respectivamente, de la toxina tetánica (Panina-Bordignon *et al.* 1989; Valmori *et al.* 1992).

Por lo tanto el empleo de la glicoproteína G de la rabia que ha demostrado ser un antígeno capaz de desarrollar una respuesta inmune por sí sola, aunado a epítopos inmunoestimulantes, como lo son los péptidos P2 o P30 de la toxina tetánica, desarrollado en un sistema de Baculovirus modificado genéticamente para la expresión eficiente de proteínas recombinante en su superficie, puede ser empleado como un vehículo de inmunización que probablemente induciría una mayor respuesta protectora para el control del virus de la rabia.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar el baculovirus como vector de inmunización a través de tres construcciones que expresan en su superficie la glicoproteína G (gG) del virus de la rabia, la gG con el epítipo P2 y la gG con el epítipo P30 en su capacidad de inducir inmunoprotección ante experimentos de inmunización/desafío.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Construir y propagar de tres baculovirus recombinantes que exhiben en su superficie la glicoproteína G (gG) del virus de la rabia, gG adicionada con el epítipo P2 (gGP2) y la gG modificada con el epítipo P30
- Evaluar y caracterizar de los niveles de expresión de la gG del virus de la rabia en los Baculovirus recombinantes.
- Evaluar de los tres baculovirus recombinantes su capacidad inmunoprotectora en pruebas de inmunización/desafío ante el virus de la rabia.



## **METAS**

- **Construcción del gen gG del virus de la rabia modificado con los epítotos P2 y P30 de la toxina tetánica y clonación en el vector de movilización al baculovirus pFastBacHa.** El gen de la gG fue modificado por PCR con oligonucleótidos que contienen los sitios de corte para las endonucleasas requeridas para la clonación así como el péptido señal requerido para la exportación, las secuencias de los epítotos P2 y P30, y la cola de histidinas requeridas para la purificación del antígeno. La amplificación se realizó a partir del gen gG previamente clonado. Los productos de amplificación fueron clonados inicialmente en un vector T. A partir del ADN de estas clonas se liberó el fragmento con enzimas de restricción para asegurar obtener el fragmento con los sitios de clonación cohesivos. Estos fragmentos se ligaron posteriormente al vector pFastBacHa previamente digerido con los sitios compatibles.
- **Obtención de los baculovirus recombinantes gGhist, gGP2, gGP30his y la evaluación de su propagación en células de insecto.** Con el ADN de las clonas recombinantes de las construcciones de la gG se transformaron bacterias DH10BAC, en donde por selección se obtuvieron los bacmidos recombinantes. Se obtuvo el ADN de los bacmidos recombinantes, con el cual se transfectaron las células de insecto SF9.
- **Evaluación de los niveles de expresión de los antígenos recombinantes gG.** La expresión y cuantificación de la proteína

recombinante en los cultivos infectados por los baculovirus recombinantes fueron evaluados por ELISA, PCR cuantitativa y Bradford.

- **Obtención y caracterización de antisueros específicos contra el virus de la rabia.** Para la obtención de antisueros específicos contra el virus de la rabia se inmunizaron bovinos con vacuna comercial y se obtuvo el suero, éste suero fue evaluado mediante prueba ELISA para medir su reactividad y especificidad.
- **Titulación del virus de la rabia en ratones.** La titulación del virus de desafío de la rabia (CVS) se realizó en ratones bal/c, por la técnica de Reed y Muench.
- **Estandarización de la Prueba de Potencia de la NIH.** Para evaluar la protección conferida por los baculovirus recombinantes, se estandarizó el número de Dosis letales al 50% del virus de la rabia a emplearse en las pruebas de desafío, así las condiciones de inmunización con una vacuna de referencia comercial como control positivo.
- **Evaluación de los niveles de protección con los baculovirus recombinantes.** Para evaluar los niveles de protección de los baculovirus recombinantes se realizó la Prueba de Potencia de NIH (National Institutes of Health) en ratones. Se realizaron 3 experimentos de desafío en donde se probaron diferentes dosis, vías de inmunización y adyuvantes. Los sueros de los ratones sobrevivientes al desafío se evaluaron por ELISA.

### **III. Material y Métodos**

#### **3.1 Amplificación y modificación del gen que codifica para gG del virus de la rabia**

El gen que codifica para la glicoproteína G (gG) del virus de la rabia se obtuvo a partir de la Clona pGQH empleada en el artículo Tesoro-Cruzet *al.* 2008.

Se realizaron tres construcciones, la primera se realizó agregando a la glicoproteína G (gG) del virus de la rabia una cola de histidinas; a la segunda construcción se le adicionó a la gG el epítipo P2 de la toxina tetánica en la porción carboxilo y en la amino una cola de histidinas (gGP2); la tercera construcción se realizaron las mismas modificaciones con diferencia que en la porción carboxilo se expresa el epítipo P30 de la toxina tetánica.

La reacción de amplificación se realizó en un volumen final de 20µl conteniendo MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, Tris-HCl pH 8.4 10mM, KCl 50mM, Gelatina 10ug, BSA 15ug, Triton X100 1%, 0.2mM de dNTP's, 1µM para cada iniciador, 2U de Taq DNA Polimerasa y 100ng de ADN.

Las condiciones de temperatura y tiempo para la amplificación del gen de la gG se estandarizaron en un gradiente de temperaturas.

### 3.1.1. Construcción gG con cola de Histidinas (gGHist)

Para la construcción de la gG con cola de Histidinas (gGHist) se utilizaron los siguientes iniciadores que se muestran en el cuadro 1 y en la figura 1 se observan los sitios de alineación.

Nombre	Secuencia 3' - 5'	Tamaño
<b>BamG1F</b>	AT <u>GGATCC</u> GATGGTTCCCKARGCTCTCCTG	30 mer
<b>BamG1R</b>	AT <u>GGATCC</u> TCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCAGTCYRG	54 mer
<b>His</b>	TCTCACCCCGCTCTTG	

**Cuadro 1** Iniciadores empleados para la construcción de la gG con cola de histidinas (gGHist). Se muestra en letras cursivas el sitio de corte para la enzima BamHI.



**Figura 1.** Sitios de alineación de los iniciadores para la construcción de la gG con cola de histidinas (gGHist).

Estos iniciadores amplifican el gen de interés y agrega sitios de corte para la enzima BamHI, péptido señal, y una cola de histidina en la porción amino terminal.

### 3.1.2. Construcción gG con P2 y cola de Histidinas (gGP2)

Para su construcción de la gG del virus de la rabia con el epítipo P2 de la toxina tetánica se utilizaron los iniciadores del cuadro 2, y en la figura 2 se muestran los sitios de alineación.

Nombre	Secuencia 3' - 5'	Tamaño
<b>PSP2gG2</b>	<u>CCATTGTGTTTTGGG</u> <b>CAGTATATAAAAGCAAATTC</b> <b>TAAATTTATAGGTATAACTGAAAATTCCCTATTTA</b> CACGATACC	80mer
<b>BamG1RHis</b>	<i>ATGGATCCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCAGTC</i> YRG TCTCACCCCGCTCTTG	54mer
<b>PSP2gG1</b>	<i>ATGGATCCG</i> <u>GTTTCCTCAGGCTCTCCTGTTTGTACC</u> <u>CCTTCTGGTTTTTCCATTGTGTTTTGGG</u>	63mer

**Cuadro 2. Iniciadores empleados para la construcción de la gG con el epítipo P2 (gGP2).** Se muestra en letras cursivas el sitio de corte para la enzima BamHI; Subrayadas el péptido señal; y en negritas la secuencia que codifica para P30 de la toxina tetánica.

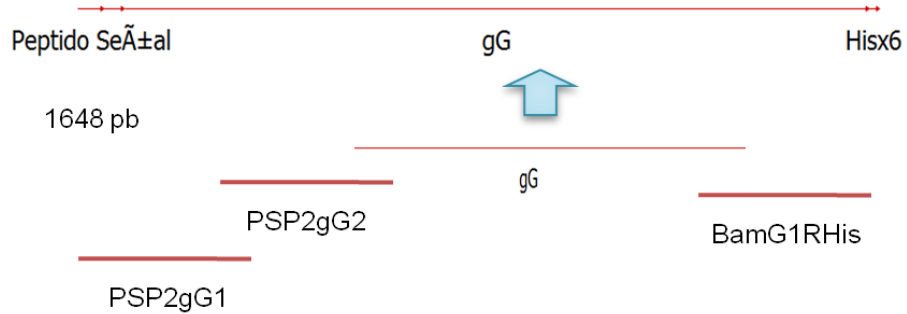


Figura 2. Sitios de alineación de los iniciadores para la construcción de la gG con cola el epítopo P2 (gGP2).

Estos iniciadores además de amplificar el gen de la gG lo modifican incluyendo sitios de corte para la enzima BamHI, y las secuencias genéticas que codifica para el péptido señal, el péptido inmuno estimulante P2 y en la porción amino terminal una cola de histidinas

### 3.1.3. Construcción gG con P30 y cola de histidinas (gGP30)

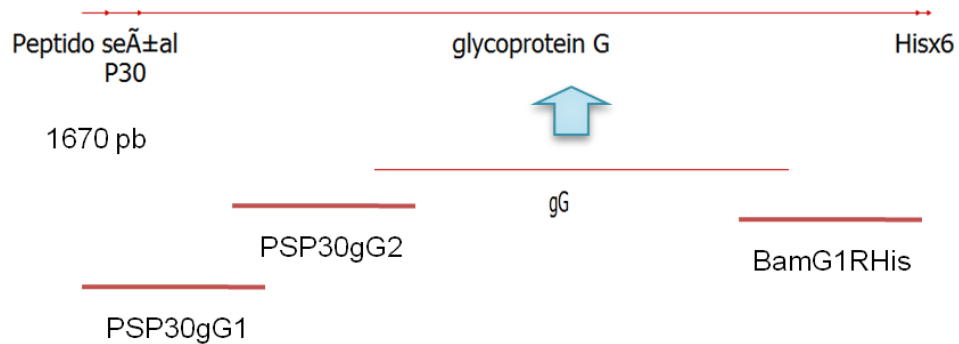
Para la construcción de su construcción de la glicoproteína del virus de la rabia con el epítopo P30 de la toxina tetánica se utilizaron los siguientes iniciadores del cuadro 3 y en la figura 3 se muestra los sitios de alineación.

Nombre	Secuencia 3' - 5'	Tamaño
<b>PSP30gG2</b>	<u>TTTAATAATTTTACCGTTAGCTTTTGGTTGAGGGTT</u> <u>CCTAAAGTATCTGCTAGTCATTTAGAAAAATTCCCT</u> ATTTACACGATAACC	86mer
<b>BamG1RHis</b>	AT <u>GGATCCTCAGTGGTGGTGGTGGTGGTGCAGTC</u>	54mer

YRGTCACACCCCGCTCTTG

**PSP30gG1** *ATGGA7CCG*GTTTCCTCAGGCTCTCCTGTTTGTACC 78mer  
CCTTCTGGTTTTTCCATTGTGTTTTGGGTTTAATAA  
TTTTACC

**Cuadro 3. Iniciadores empleados para la construcción de la gG con el epítipo P30 (gGP30).** Se muestra en letras cursivas el sitio de corte para la enzima BamHI; Subrayadas el péptido señal; y en negritas la secuencia que codifica para P30 de la toxina tetánica.



**Figura3. Sitios de alineación de los iniciadores para la construcción de la gG con el epítipo P30 (gGP30).**

Los cuales modifican de la gG de la misma forma que la construcción anterior excepto por la secuencia genética que codifica para el epítipo inmuno dominante P30 de la toxina tetánica.

### 3.2 Purificación del producto amplificado.

El producto amplificado se obtuvo del gel para purificarlo con Ni y perlas de sílica. Se cortaron las bandas correspondientes, se colocaron en un tubo eppendorf. Se agregaron 3 volúmenes de NaI, se incubó durante 10 minutos a 55°C. Posteriormente se adicionaron las perlas de sílica frías, se mezclaron por inversión

y se incubó en hielo durante 1 hora. Posteriormente se centrifugó a 8000g/4 minutos/4°C y se decantó el sobrenadante. La pastilla fue resuspendida. Con solución de lavado de perlas (50mM NaCl, 10mM Tris-HCl pH 7.5 y v/v con etanol 100%), se centrifugó a 8000g/4 minutos/4°C. Se resuspendió la pastilla con agua destilada estéril. Se incubó a 55°C durante 5 minutos, se centrifugó a 8000g/4 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó el sobrenadante, se cuantificó y se corrió en gel de agarosa al 1% por electroforesis.

### 3.3 Clonación en el vector PGEM-T

Se clonaron las diferentes construcciones en el vector PGEM-T con el objetivo de tener ADN suficiente y mantener la integridad de los extremos cohesivos de la enzima *BamHI* para ser subclonados en el vector pFAST BAC.

La reacción de ligación se llevo a cabo con el siguiente protocolo:

Reactivos	Stock	Final	1 rx.
ADN Plasmídico	50ng/μl	50 ng	1.0 μl
Inserto	-	-	3.0 μl
Buffer de ligación	2X	1X	5.0 μl
T <sub>4</sub> ligasa	3u/μl	1 u / rx	1 .0 μl
Agua	-	cbp 10 μl	-



El producto de la ligación se transformó en células DH5 $\alpha$  (100 $\mu$ l) por choque térmico. Se colocaron por 30 minutos en hielo, 1 minuto a 42°C, 2 minutos en hielo. Se adicionó medio LB cbp 1 ml e incubó durante 60 minutos a 37°C. Después se sembró en agar LB con ampicilina (100  $\mu$ g/ml), IPTG (266  $\mu$ g/ml) y X-Gal (266  $\mu$ g/ml).

Las colonias fueron seleccionadas por color (colonias blancas), y después confirmarlas por PCR con los iniciadores específico; dado que el vector tiene el gen reportero Lac Z en el sitio múltiple de clonación, y al ser interrumpido por el inserto, no se puede metabolizar el análogo de la lactosa X-Gal.

Estas colonias fueron sembradas en 3 ml de medio de cultivo líquido LB con ampicilina y se mantuvieron en agitación ya temperatura de 37°C por 12 horas para su propagación.

#### **3.4 Técnica de Mini preparación de ADN Plasmídico (Miniprep).**

El cultivo se centrifugó a 8000g/7minutos, el sobrenadante fue decantado. La pastilla se resuspendió con 200  $\mu$ l de solución de lisis (8 % de sacarosa, 5 % de tritón X-100, 50mM de EDTA y 50mM de tris pH 8) y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se adicionó lisozima a 1.25  $\mu$ g/  $\mu$ l, se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. La muestra se llevó a 95° C en baño húmedo por 1 minuto y se centrifugó 8000g/10minutos. Se recuperó el sobrenadante, al cual se le agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío, se incubó a -20°C/30 minutos y se centrifugó a 8000g/10 minutos. Se realizaron dos

lavados con etanol al 70%, se centrifugo a 8000g/5minutos y se decanto el sobrenadante. La pastilla se secó, por calor a 55°C y fue resuspendida en agua destilada estéril. Para corroborar nuestra purificación y la calidad del ADN se realizo una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

### 3.5 Clonación en vector PFAST-BAC

El ADN del plásmido obtenido del vector pGEM-T se digirió con la enzima BamHI para recuperar el inserto con el siguiente protocolo:

Reactivos	Stock	Final	1 rx.
ADN plasmídico	-	50 µl/rx	50 µl
BamH1	50u/µl	1u/rx	1.5 µl
Buffer con BSA	10X	1X	15 µl
Agua	-	cbp 150 µl	83.5 µl

El inserto linearizado y liberado se clono en el vector pFAST-BAC con el siguiente protocolo:

Reactivos	Stock	Final	1 rx.
Vector pFBHTa	100ng/μl	200ng	2μl
Inserto	40ng/μl	70ng	1.75μl
Buffer de ligación	10X	1X	2μl
T <sub>4</sub> ligasa	1U/μl	1 U/rx	1 μl
Agua		cbp 20μl	13.25 μl

Las colonias fueron seleccionadas por PCR utilizando los iniciadores del inserto, para posteriormente seleccionar sólo las clonas correctamente orientadas, esto se realizo utilizando los iniciadores del inserto y del vector, las clonas correctamente orientadas amplificaron con el iniciador anterior del vector y el iniciador posterior del inserto, y las clonas incorrectamente orientadas con los iniciadores anterior del vector y el iniciador anterior del inserto.

Se realizo la técnica de mini preparación descrita anteriormente para recuperar el ADN del plásmido.

Se realizo una electroforesis en un gel de agarosa al 1% para verificar la extracción y ver la calidad del ADN.

### **3.6 Transposición en células competentes DH10BAC.**

Se realizó la transposición en células competentes DH10BAC, las cuales han sido modificadas genéticamente y con ayuda de un plásmido cooperador insertan en su genoma el ADN plasmídico obtenido de la clonación anterior. Se realizó en siguiente protocolo de transformación:

1. Se colocaron 100  $\mu$ l de células competentes DH10BAC® de Life Technologies en hielo.
2. Se agregaron 40ng del plásmido recombinante y se mezclaron por vortex.
3. Incubación en hielo 30 minutos.
4. La mezcla se expuso a un choque térmico de 42°C por 1 minuto.
5. Se enfrió en hielo durante 2 minutos.
6. Se agregaron 900  $\mu$ l de medio SOC.
7. Los tubos se incubaron en agitación (225 rpm) a 37°C por 4 horas.
8. Fueron espatulados 100  $\mu$ l de cada dilución. En placas de agar LB con 50  $\mu$ g/ml de kanamicina, 7  $\mu$ g/ml de gentamicina, 10  $\mu$ g/ml de tetraciclina, 200 $\mu$ g/ml de X-gal, 200  $\mu$ g/ml de IPTG.
9. Las placas fueron incubadas a 37°C por 48 horas.

Las clonas fueron seleccionadas por color y por PCR para determinar su correcta transposición. Las clonas correctamente transpuestas se seleccionaron utilizando el iniciador anterior del inserto y el iniciador posterior de M13.

Las clonas seleccionadas fueron sembradas en medio LB con 50 µg/ml de kanamicina, 7 µg/ml de gentamicina, 10 µg/ml de tetraciclina, en agitación, a 37°C por 12 horas. Se realizó la técnica de Miniprep para obtener el ADN del Bócmido.

### **3.7 Transfección de las células SF9**

Para la transfección se utilizaron células de insecto SF9, sembradas en placa de 6 pozos con fondo plano cultivadas a una densidad celular de  $9 \times 10^5$  células por mililitro en 2ml medio Sf-900™ II SFM de GIBCO, sin suero sin suplementos, y se dejaron incubando 1 hora a 27°C.

Para cada transfección se elaboraron las siguientes soluciones:

- a. Se colocaron 1 o 2 µg de DNA Bócmido en un tubo eppendorf y se agregaron 100 µL de medio sin suplementos y se mezclaron lentamente por inversión
- b. Se colocaron 6 µL de Cellfectin® Reagent Invitrogen en un eppendorf y se agregaron 100 µL medio sin suplementos, sin antibiótico y mezclaron lentamente por inversión.

Se combinaron las soluciones A y B lentamente por inversión, y se dejó incubar la mezcla de 15 a 45 minutos a temperatura ambiente. Pasando los tiempos de

incubación se retiro el sobre nadante de la placa de 6 pozos. Se agregaron a cada pozo 800  $\mu$ L de Medio Sf-900™ II SFM sin suplementos y se agregaron 200 $\mu$ L de la mezcla.

Se incubo la placa por 5 horas a 27°C. Pasado el tiempo de incubación removio el sobrenadante a cado pozo y se agregaron 3ml de medio Sf-900™ II SFM con antibiótico.

Se recolecto el sobrenadante 72 horas post-transfección.

### **3.8 Propagación de Baculovirus Recombinantes.**

Evaluada la transfección, se realizó un pase ciego inoculando 500  $\mu$ L del sobrenadante en un volumen de 15ml de medio Sf-900™ II SFM con una densidad celular de  $1.6 \times 10^6$  células por mililitro, colectando el sobrenadante 4 días post-infección. Esta propagación fue tomada como semilla para infecciones posteriores.

Para propagar los virus de desafío se determino la mejor Multiplicidad de la Infección (MOI), probando cuatro diferentes concentraciones virales, 0.1 virus/célula (MOI -1), 0.01 virus/célula (MOI -2), 0.001 virus/célula (MOI -3) y 0.0001 virus/célula (MOI -4), con una densidad celular de  $1.6 \times 10^6$  células por mililitro en medio Sf-900™ II SFM, y se evaluaron por medio de ELISA indirecta y PCR cauntitativa (QPCR)

Una vez determinado la mejor MOI se realizaron infecciones controladas con una densidad de  $1.6 \times 10^6$  células por mililitro en medio Sf-900™ II SFM para los

diferentes baculovirus. El sobre nadante fue cosechado cuarto día post- infección para su evaluación.

### **3.9 Técnica de ELISA Indirecta**

Para la evaluación de la expresión de antígeno recombinante en los Baculovirus se utilizo la técnica de ELISA indirecta en placas de 96 pozos de fono plano con el siguiente protocolo.

1. Se sensibilizó la placa con los Baculovirus en diluciones 1/10 y 1/100 por duplicado utilizando buffer de carbonatos y se deja incubando toda la noche a 4°C
2. Pasado el tiempo de incubación se lavo la placa (300ul/pozo) por 5 minutos, 4 veces con buffer de lavado 1X.
3. Se bloqueo la placa por 1 hora a 37°C colocando a cada pozo 100 µl de buffer de bloqueo, pasado el tiempo de incubación se repitió le paso 2
4. Como primer anticuerpo se utilizó suero de bovino hiperimmune contra el virus rabia en dilución 1/10 colocando 100 µl/pozo, se incubo la placa por 1 hora a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación se repitió el paso 2
5. Como segundo anticuerpo se utilizaron anticuerpos contra bovino acoplado a peroxidasa para su posterior revelación, este se utilizó en dilución 1/800 colocando 100 µl/pozo, se incubó la placa por 1 hora a 37°C. Finalizado el tiempo de incubación se repitió el paso 2

6. Para revelar la placa se utilizó 100  $\mu$ l/pozo de solución reveladora con OPD, se dejó incubar 5 minutos y posteriormente se agregó 100  $\mu$ l/pozo de solución de frenado.
7. La lectura se realizó a 450nm.

### 3.10 Técnica de Bradford

Procedimiento para cuantificación de proteínas placas de microtitulación

1. Se preparo el reactivo colorante diluyendo 1 parte de colorante **BIO-PROTEIN ASSEY**<sup>®</sup> concentrado con 4 partes de agua destilada, y se filtro a través de un filtro Whatman # 1 para eliminar las partículas.
2. Se prepararon cinco diluciones de la proteína estándar. El intervalo lineal de este ensayo de microtitulación en placa fue de 0.05 mg / ml a aproximadamente 0.5 mg / ml. Soluciones de proteínas fueron analizadas por analizaron por duplicado o triplicado.
3. Se dispensaron 10 $\mu$ l de cada solución estándar y 10 $\mu$ l de la muestra en los pozos de placas de microtitulación.
4. Se añadieron 190  $\mu$ l de reactivo colorante diluido a cada pozo. Se mezclaron las muestras y el reactivo a utilizando una pipeta multicanal.
5. La placa se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.
6. La absorbancia se midió a 595nm.
7. Obtuvieron las lecturas gráficas y se calculó la linealidad de la recta para cuantificar usando la ecuación de la recta.



### 3.11 Técnica de PCR Cuantitativa (qPCR)

Para identificar y cuantificar los baculovirus mediante qPCR, nos basamos en el artículo de Hitchman, *et al.* 2007. Se sintetizaron los iniciadores y una sonda TaqMAN los cuales se muestran en el cuadro 4, éstos amplifican y detectan un fragmento de 61 pb localizado dentro del gen de la proteína gP64 del virus AcMNPV. Este fragmento se clonó en un vector T, para realizar la curva de cuantificación de los baculovirus.

Nombre	Secuencia 3´- 5´	Tamaño
<b>Gp64RTF</b>	CGGCGTGAGTATGATTCTCAA	22 pb
<b>Gp64RTR</b>	ATGAGCAGACACGCAGCTTTT	20 pb
<b>Gp64- P109075</b>	[FAM]-AAAAGTCTACGTTACCCACGCGCCAAA- [TAMRA]	27 pb

Cuadro 4. Iniciadores empleados para la QPCR. pb: pares de bases

Los componentes, las concentraciones presentes en cada stock, las concentraciones finales en la reacción y el volumen en microlitros de cada componente para cada reacción se muestran en el cuadro 5.

Reactivo	Concentración del Stock.	Concentración Fina	Reacción
Buffer	10x	1x	2µl
MgCl <sub>2</sub> 30mM	30mM	3mM	2µl
dNTPs 2mM	2mM	0.2µM	2µl
Iniciadores F/R	10 µM	0.5µM	1µl
Sonda	10 µM	0.1µM	0.2µl
Taq Pol	5U/µl	2 U	0.4µl
H <sub>2</sub> O	Cbp	cbp 10µl	2.4µl
ADN	-	-	10µl

Cuadro 5. Componentes y concentraciones de la mezcla de reacción.

Las condiciones de temperatura para la qPCR se muestran en el cuadro 6.

Temperatura	Tiempo	Ciclos
95°C	10 minutos	1
95°C	15 Segundos	45
60°C	45 Segundos	

Cuadro 6 Temperaturas y número de ciclos para la QPCR.

### 3.12 Titulación del virus de la rabia

La titulación del virus de la rabia se realizó mediante el método de Reed y Muench. Se utilizaron 7 ratones hembras de 4 semanas de edad y de 11 a 15 g de

peso por grupo. Se realizaron cinco grupos los cuales fueron inoculados con el virus de la rabia cepa CVS en diluciones decuples seriadas a partir de 1/10, por vía intra-cerebral y en un volumen final de 0.030ml.

Los ratones fueron observados 14 días post-inoculación. Soló se atribuyeron al virus de la rabia las muertes después del quinto día y los ratones que quedaron paralizados pero vivos después del periodo de observación.

### **3.13 Estandarización de la Dosis Letales al 50% y Vacuna de referencia.**

Para la determinación del número de dosis letales al 50% (DL50%) y obtener una vacuna de referencia para evaluar los inóculos, se realizo la prueba de NIH empleando tres diferentes DL50% del virus de rabia: 5 DL50%, 25 DL50% y 50 DL50%. Para evaluar la vacuna de referencia (Defensor<sup>®</sup>1 de Pfizer S.A. de C.V.) se utilizo una dosis de vacuna y en dilución 1/5 de la vacuna comercial de virus inactivado diluida con Solución PBS.

#### 3.13.1. Inmunización de los Ratones.

Se utilizaron 7 ratones de 4 semanas de edad y de 11 a 15 g de peso por grupo, se les inyectó 0.5 ml del inóculo por vía intraperitoneal. Todos los ratones recibieron dos dosis de vacuna con una semana de intervalo. En el cuadro 7 se muestra el número de ratones por grupo.

	Dilución de la vacuna 1/5			Control negativo (Sin Vacunar)			Control positivo (Vacuna comercial sin Diluir)		
	50	25	5	50	25	5	50	25	5
<b>DL 50%</b>	50	25	5	50	25	5	50	25	5
<b>Ratones</b>	7	7	7	7	7	7	7	7	7
<b>Total de ratones</b>	63								

Cuadro 7 Numero de ratones para la estandarización de Dosis Letales 50%(DL50%) y vacuna de referencia.

### 3.13.2. Desafío de los ratones.

A los 14 días de administrar la primera dosis de vacuna, se inoculó el virus a todos los ratones por vía intracerebral. Se inocularon en los ratones inmunizados la dilución del virus (5, 25 y 50 DL 50%) en un volumen de 0.03ml.

Se observaron todos los ratones durante 14 días, a partir de la inoculación del virus. Soló se atribuyó al virus de la rabia las muertes después del quinto día y las que fueron precedidas de signos de rabia (parálisis, convulsiones). También se contaron como víctimas de rabia todos los ratones que queden paralizados pero vivos después del periodo de observación de 14 días

### **3.14 Desafío de ratones inmunizados con vacunas recombinantes.**

Para evaluar los niveles de protección conferidos por estos antígenos recombinantes contra un desafío letal del virus de la rabia. Para esto se inmunizaron ratones BALB/C 11 a 13g, hembras, con 500ul de los antígenos.

Se tuvieron 8 grupos de 7 ratones cada uno para evaluar cada inmunógeno y los controles. Se evaluó una dosis de  $5 \times 10^7$  copias virales por dos vías de inmunización: intranasal e intraperitoneal. El control positivo fué inmunizado intraperitonealmente con una vacuna inactivada comercial (Defensor<sup>®</sup>1 de Pfizer S.A. de C.V.) diluida una dosis para cinco ratones, y el control negativo con PBS.

Se realizaron dos inmunizaciones, con un refuerzo a los 7 días post inmunización y se realizó el desafío a los 14 días post inmunización con una inyección intracerebral 25DLRA50%/30µl del virus de la rabia cepa CVS.

En el cuadro 8 se muestran el esquema de inmunización para cada grupo por vía intraperitoneal e intranasal.

<b>GRUPO</b>	<b>Construcción</b>	<b>Vía de inoculación</b>	<b>Ratones</b>
<b>1</b>	control (+) Vacuna 1/5	Intraperitoneal	7
<b>2</b>	control (-) PBS	Subcutánea	7
<b>3</b>	gGHist 5 X10 <sup>8</sup> copias	Intraperitoneal	7
<b>4</b>	gGHist 5 X10 <sup>8</sup> copias	Intranasal	7
<b>5</b>	gGP2 5 X10 <sup>8</sup> copias	Intraperitoneal	7
<b>6</b>	gGP2 5 X10 <sup>8</sup> copias	Intranasal	7
<b>7</b>	gG P30 5 X10 <sup>8</sup> copias	Intraperitoneal	7
<b>8</b>	gG P30 5 X10 <sup>8</sup> copias	Intranasal	7
<b>Total</b>			<b>56</b>

**Cuadro 8 Esquema de inmunización experimento de desafío.** Ratones inmunizados con: gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, gGP2: glicoproteína G con el epítipo P2, gGP30: glicoproteína G con el epítipo P30, IP: vía intraperitoneal, IN: vía intranasal.

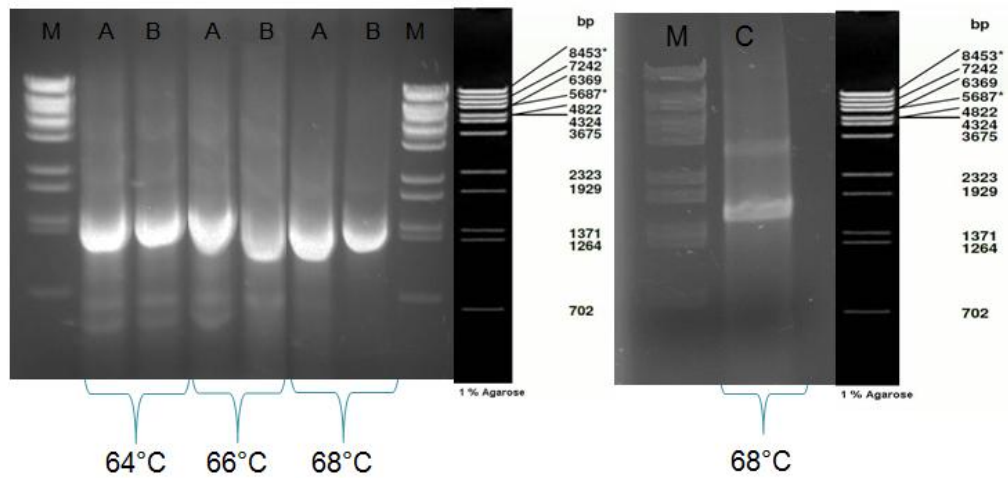
## **IV. Resultados**

### **4.1 Amplificación y modificación del gen que codifica para gG del virus de la rabia.**

Para generar las construcciones genéticas del gen gG, este se amplificó a partir del plásmido pCIneogG empleando los iniciadores que se ilustra en los cuadros 1, 2 y 3. Se generaron tres construcciones gGHist, gGP2 y gGP30. En la construcción de gGHist, se efectuó una sola amplificación. En el caso de las otras dos construcciones se realizaron dos amplificaciones, en donde la segunda empleó como sustrato el producto de amplificación de la primera PCR.

#### **4.1.1. Amplificación con el primer juego de iniciadores.**

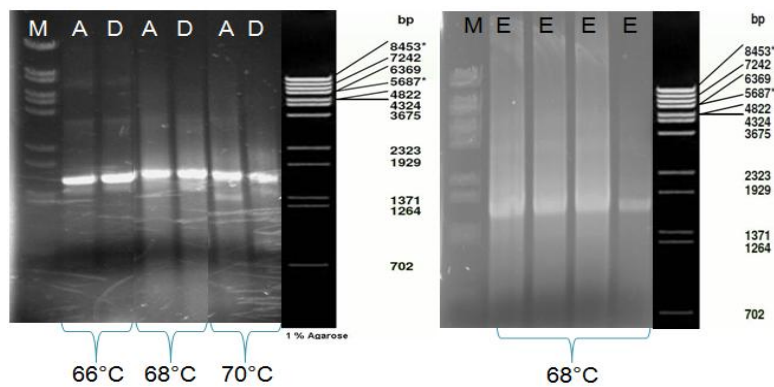
Con la finalidad de seleccionar la temperatura óptima de amplificación, se realizó un gradiente de temperatura probando 64°, 66°, y 68°C para el primer juego de iniciadores de cada construcción, se amplificó un fragmento de 1,890pb para gGHist, 1,900pb para gGP2 y 1,985 para gGP30, en las tres temperaturas, figura 4.



**Figura 4. Amplificación de la gG de rabia con el primer juego de primer.** Geles de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio. Se muestran las distintas construcciones: A= glicoproteína G (gG) con cola de Histaminas, B= gG con el epítipo P2, C= gG con el epítipo P30, M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEtlI).

#### 4.1.2. Amplificación de PCR anidada con el segundo juego de iniciadores.

Para la PCR anidada con el segundo juego de iniciadores se realizó un gradiente de temperatura probando 66, 68, y 70°C para estandarizar la temperatura de amplificación. Se amplificó un fragmento de 1890pb para gGhist, 1900 para gGP2 y 1985 para gGP30, en las tres temperaturas probadas, figura 5.

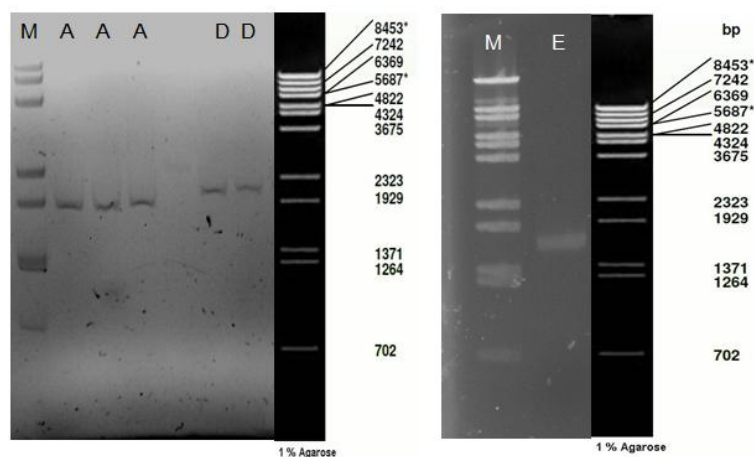


**Figura 5. Amplificación de gen gG del virus de la rabia con el segundo juego de iniciadores.** Geles de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio. Se muestran las distintas construcciones: A= glicoproteína G (gG) con cola de Histaminas, D= gG con el epítipo P2, E= gG con el epítipo P30, M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEtlI).



#### 4.1.3. Purificación del producto amplificado.

Posterior a la amplificación de los fragmentos de la PCR anidada para cada construcción se recortaron las bandas obtenidas y se purificaron con yoduro de sodio y perlas de silica. En la figura 6 se muestra una electroforesis en donde se confirma la recuperación de los fragmentos.



**Figura 6. Recuperación de los fragmentos purificados.** Geles de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio. Se muestran las distintas construcciones: A= glicoproteína G (gG) con cola de Histaminas, D= gG con el epítipo P2, E= gG con el epítipo P30, M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEII).

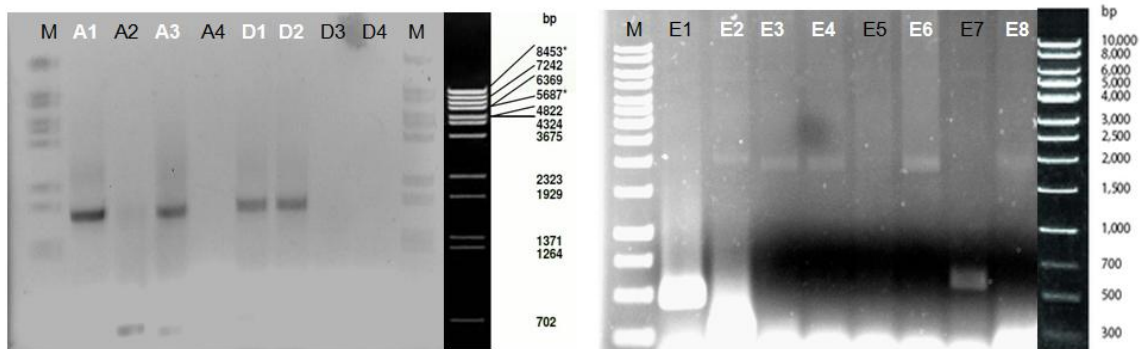
#### 4.2 Clonación en el Vector PGEM-T

Los productos de amplificación de las tres construcciones purificadas se clonaron en el vector pGEM-T. Esta clonación se realizó con el fin de garantizar los sitios cohesivos para la enzima BamHI, necesarios subclonarlos en el vector pFastBac.

Los tres plásmidos obtenidos, se utilizaron para transformar células competentes de *E. coli* cepa DH5 $\alpha$ .

#### 4.2.1. Selección de clonas con el inserto

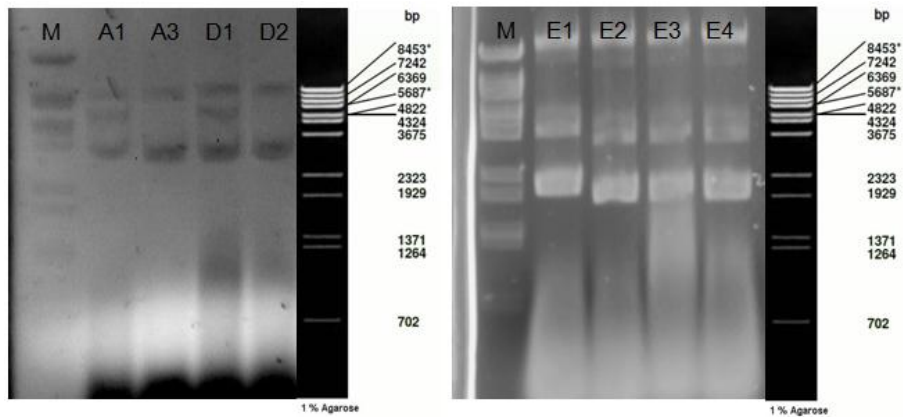
Para seleccionar las clonas que tenían clonado el inserto, se realizó una PCR con los iniciadores M13, y se seleccionaron las que tenía el peso correspondiente para cada construcción, esto se muestra en la figura 7.



**Figura 7 Selección de clonas recombinantes en el vector T.** Electroforesis en geles de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio, en donde se muestran los productos de amplificación con los iniciadores de M13 de las clonas recombinantes candidatas. Se muestran las distintas construcciones: A= glicoproteína G (gG) con cola de Histaminas, C= gG con el epítipo P2, E= gG con el epítipo P30, M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEtlI). Las clonas seleccionadas se muestran en color blanco.

#### 4.2.2. Mini Preparación de ADN de plásmidos

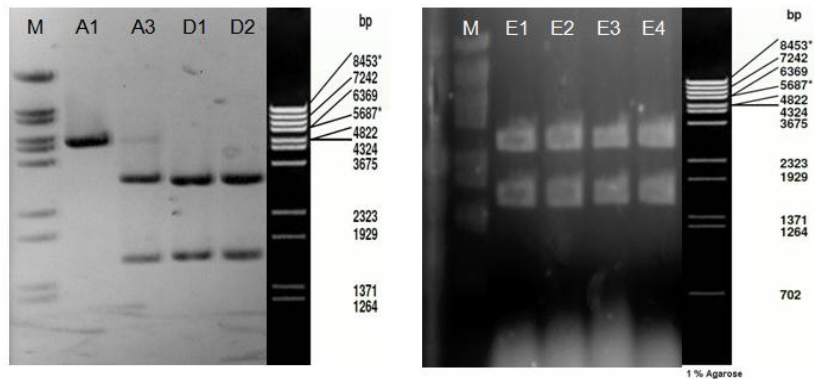
Para obtener suficientes cantidades de ADN de los plásmidos y obtener producto de digestión suficiente para clonar en el siguiente vector, las clonas seleccionadas se crecieron en un volumen de 15 ml de medio de cultivo con ampicilina. El ADN plasmídico fue purificado mediante la técnica de mini preparación de ADN de plásmidos (MiniPrep), la figura 8 muestra los plásmidos ya purificados.



**Figura8 Plásmidos purificados de las clonas seleccionadas en vector T.** Geles de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio. Se muestran las distintas construcciones: A= glicoproteína G (gG) con cola de Histaminas, D= gG con el epítipo P2, E= gG con el epítipo P30, M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEII).

#### 4.2.3. Digestión con enzima BamHI

Una vez purificado los plásmidos, para liberar los insertos clonados con los extremos cohesivos, estos fueron digeridos con la enzima BamHI. En la figura 9 se muestran los plásmidos digeridos con la enzima BamHI.



**Figura9 Digestión de los plásmidos purificados con la enzima BamHI.** Geles de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio. Se muestran las distintas construcciones: A= glicoproteína G (gG) con cola de Histaminas, C= gG con el epítipo P2, E= gG con el epítipo P30, M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEII).

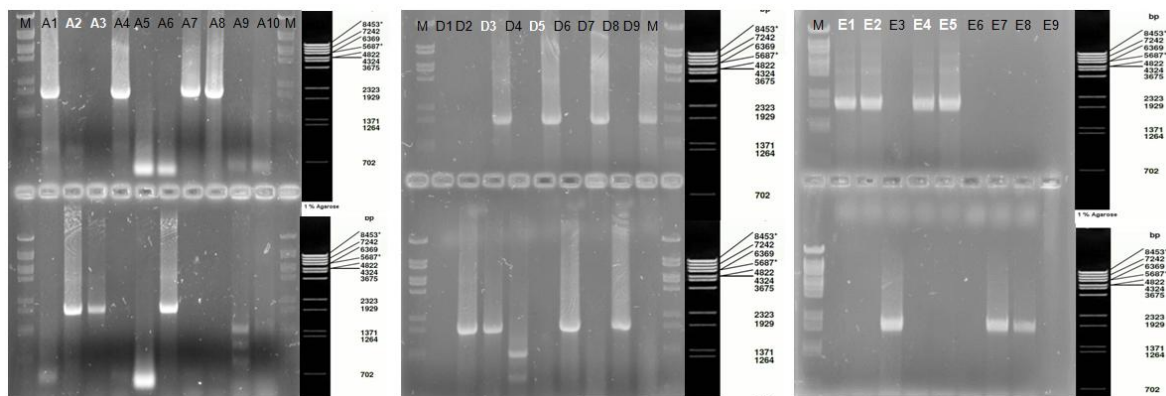
### 4.3 Clonación en Vector PFAST-BAC

Posteriormente a la liberación de los insertos, estos fueron purificados del gel y clonados en el vector de movilización pFAST-BAC, el cual contiene parte del genoma de Baculovirus.

#### 4.3.1. Clonación en Vector pFAST-BAC

Ya obtenidos los plásmidos se utilizaron para transformar células competentes cepa DH5α de *E. coli*.

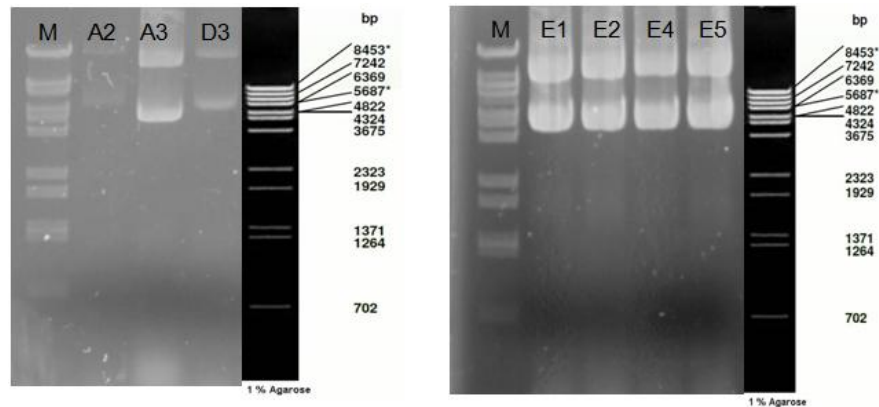
Para seleccionar las clonas recombinantes y correctamente orientadas se realizó una PCR con el iniciador delantero del inserto y el iniciador reverso del vector. Las clonas recombinantes y correctamente orientadas se muestran en la figura 10.



**Figura 10. Selección de clonas con el inserto en el vector pFast-Bac.** Geles de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio. Se muestran las distintas construcciones: A= glicoproteína G (gG) con cola de Histaminas, C= gG con el epítipo P2, E= gG con el epítipo P30, M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEII). Las clonas seleccionadas se muestran en color blanco.

### 4.3.2. Mini Preparación de ADN de plásmidos

Las clonas recombinantes seleccionadas, se propagaron en un volumen de 15ml de medio de cultivo, y se purificó el ADN plasmídico por la técnica de MiniPrep. En la figura 11 se muestra el ADN plasmídico purificado de las tres construcciones.



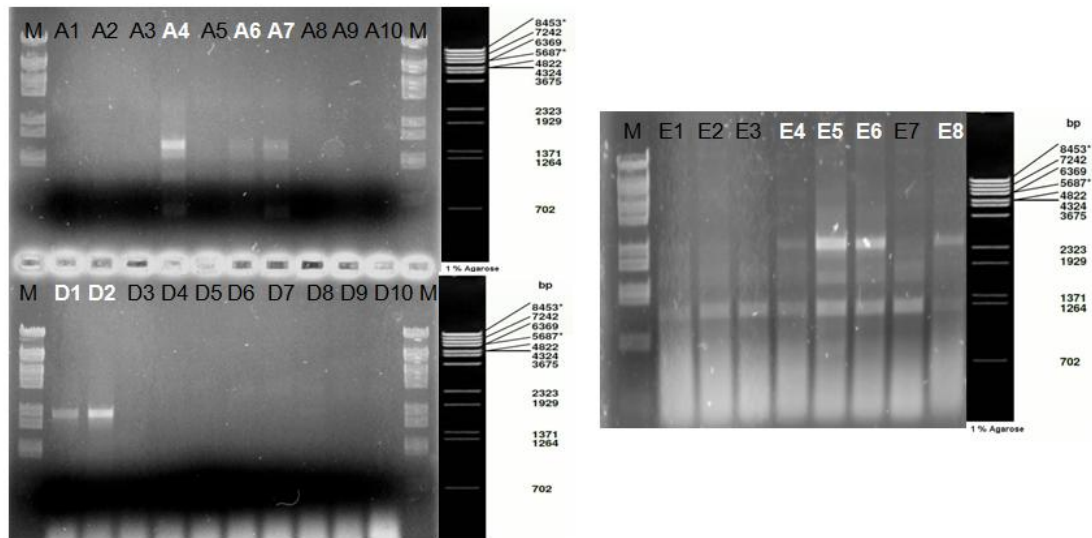
**Figura 11** Plásmidos purificados de las clonas seleccionadas en vector pFast-Bac. Geles de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio. Se muestran las distintas construcciones: A= glicoproteína G (gG) con cola de Histaminas, D= gG con el epítipo P2, E= gG con el epítipo P30, M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BseII).

## 4.4 Transposición en células competentes DH10BAC

Una vez obtenido el ADN plasmídico de las clonas recombinantes en pFAST-BAC se transformaron células competentes cepa DH10BAC de *E. coli*, con el fin de insertar mediante transposición en el genoma del baculovirus la secuencia genética de las tres construcciones de la gG del virus de la rabia.

### 4.4.1. Selección de Clonas Correctamente Transpuestas

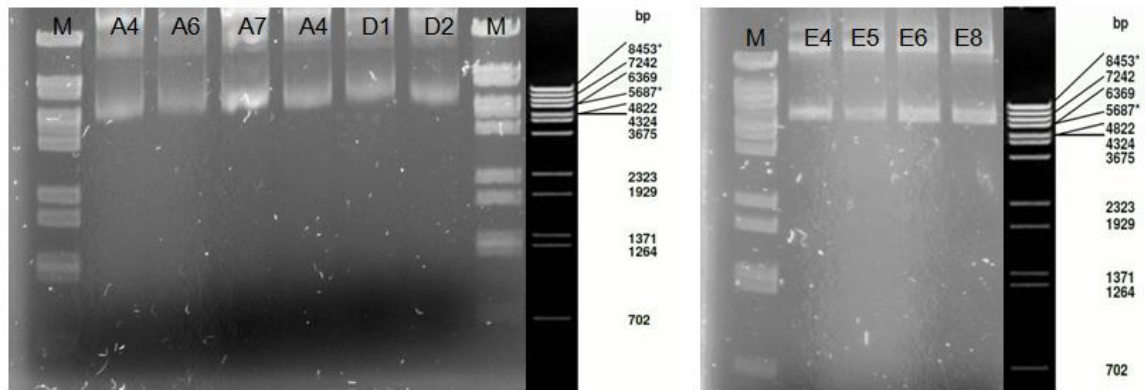
Para la selección de clonas recombinantes y correctamente transpuestas se realizó una PCR con el iniciador delantero del inserto y el iniciador reverso del vector. En la figura 12 se muestran las clonas seleccionadas.



**Figura 12. Selección de b́acmidos recombinantes correctamente transpuestos.** Geles de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio. Se muestran las distintas construcciones: A= glicoproteína G (gG) con cola de Histidinas, C= gG con el epítoto P2, E= gG con el epítoto P30, M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEII). Las clonas seleccionadas se muestran en color blanco.

#### 4.4.2. Mini Preparación de ADN de B́acmidos

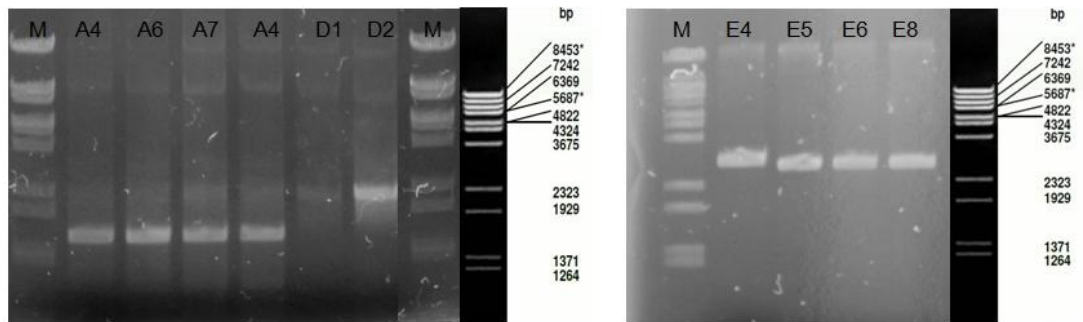
Las clonas recombinantes seleccionadas, se propagaron en un volumen de 15ml de medio de cultivo, y se purifico el ADN de los b́acmidos recombinantes por la t́cnica de MiniPrep. En la figura 13 se muestra el ADN de los b́acmidos purificado de las tres construcciones.



**Figura 13** Báculos purificados de las clonas seleccionadas. Geles de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio. Se muestran las distintas construcciones: A= glicoproteína G (gG) con cola de Histidinas, D= gG con el epítipo P2, E= gG con el epítipo P30, M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEII).

#### 4.4.3. PCR de Báculos Seleccionados

Se realizó una PCR con los iniciadores específicos de los insertos clonados, para comprobar que el ADN de los báculos recombinantes incluyeran la secuencia genética de las diferentes construcciones, en la figura 14 se muestra la amplificación de los fragmentos de los insertos.



**Figura 14** PCR de los báculos purificados seleccionados. Geles de Agarosa al 1% teñidos con bromuro de Etidio. Se muestran las distintas construcciones: A= glicoproteína G (gG) con cola de Histaminas, C= gG con el epítipo P2, E= gG con el epítipo P30, M= Marcador de Peso Molecular (ADN Lambda digerido con BsEII).

#### 4.4.4. Transfección en células de insecto SF9.

Con el fin de obtener los baculovirus recombinantes infecciosos, se transfectaron células de insecto de la línea celular SF9 con el ADN de los bácmidos recombinantes, con la técnica anteriormente descrita. Pasando 72 horas post infección se evaluaron los niveles de expresión del antígeno recombinante por medio de ELISA y por qPCR el número de copias virales.

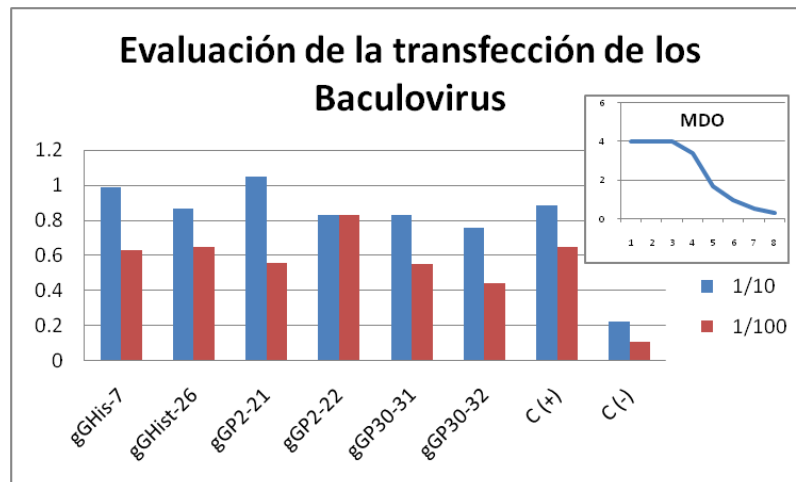
### **4.5 Evaluación de la expresión de antígenos recombinantes y número de copias virales.**

Para medir los niveles de expresión de los baculovirus recombinantes se realizaron pruebas de ELISA indirecta, pruebas de Bradford para medir la cantidad de proteína total y qPCR para medir el número de copias virales por microlitro.

#### 4.5.1. Evaluación de Transfección.

Para evaluar que las transfecciones se llevaron a cabo correctamente, se cosechó el sobrenadante de estas para ser evaluarlos por ELISA. En la figura 15 se muestran los resultados de la transfección.



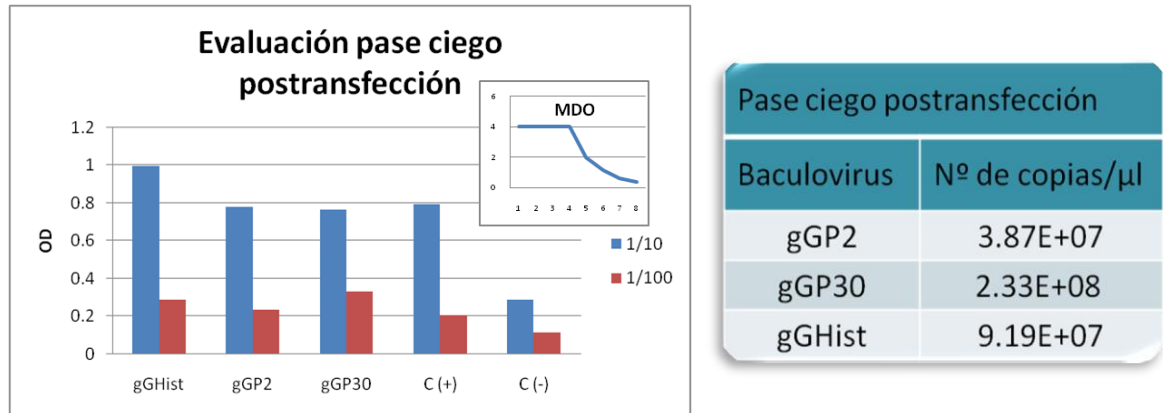


**Figura 15. Reactividad antigénica de la transfección de los baculovirus.** ELISA sensibilizada con Baculovirus en diluciones 1/10 y 1/100 que expresan: gGHis: glicoproteína G con cola de Histidinas, gGP2: glicoproteína G con el epítipo P2, gGP30: glicoproteína G con el epítipo P30, C (+): Baculovirus que expresa glicoproteína G; C (-): Baculovirus expresa Proteína M de influenza. Primer anticuerpo: suero hiperinmune de bovino contra el virus de la rabia en dilución 1/10; segundo anticuerpo: Antibovino acoplado a peroxidasa en dilución 1:1000; revelado con OPD.

Los resultados muestran que los tres baculovirus expresan la gG del virus de la rabia, al evaluarse con suero hiperinmune contra el virus de la rabia, de la misma forma que el control positivo. Por lo que inferimos que se realizó una transfección exitosa, produciendo baculovirus recombinantes.

#### 4.5.2. Evaluación Pase ciego Post-transfección

Una vez evaluada la transfección de las diferentes construcciones, se realizó un pase ciego de estos baculovirus recombinantes para tener un mayor volumen y concentración de los baculovirus para usarlo como semilla en posteriores infecciones controladas. Para esto se infectaron  $1 \times 10^6$  células Sf9 en un volumen de 15ml con 500µl de la transfección, dejando incubar por 4 días. En la figura 16 se muestra la evaluación por ELISA y por qPCR del sobrenadante de las infecciones de los pases ciegos.



**Figura 16. Evaluación de la reactividad antigénica y número de copias virales de los baculovirus** obtenidos en el pase ciego. Ensayos de ELISA y qPCR TR de los baculovirus: gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, gGP2: glicoproteína G con el epítipo P2, gGP30: glicoproteína G con el epítipo P30, C (+): Baculovirus que expresa glicoproteína G; C (-): Baculovirus expresa Proteína M de influenza

La evaluación por qPCR (qPCR) y ELISA indirecta muestra que los baculovirus se están replicado, ya que son detectados por qPCR el cual amplifica una secuencia genética de la proteína gP64 de este virus. La prueba de ELISA indirecta, al igual que en la transfección tiene reactividades muy similares a las obtenidas por nuestro control positivo.

#### 4.5.3. Evaluación de la producción de baculovirus recombinantes dependiendo de la multiplicidad de infección (MOI).

Para la determinación de las condiciones de infección que se obtiene la mayor producción de antígeno recombinante y de baculovirus recombinantes, se realizaron infecciones probando cuatro MOI, haciendo una correlación entre el número de copias virales determinado por qPCR y el número de unidades virales. En el

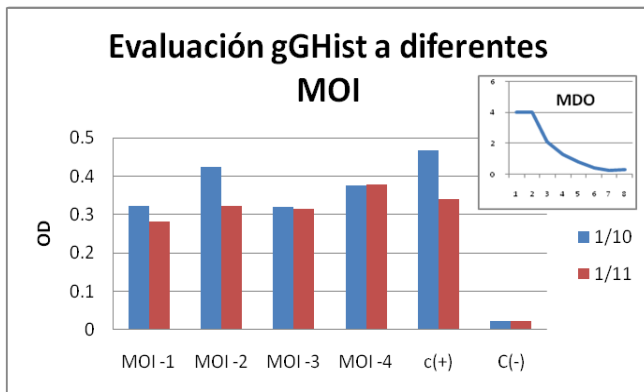
cuadro 9 se muestran los calculos para determinar los volumenes de cada baculovirus que se requiere tomar para infectar a los diferentes MOI.

Baculovirus	C. V./ $\mu$ l	C. V./ U. V.	U.V./ $\mu$ l	MOI -1	MOI -2	MOI -3	MOI -4
gGHist	9.19E+07	12.03	7.64E+06	0.02 $\mu$ l	0.002094 $\mu$ l	0.000209 $\mu$ l	0.000021 $\mu$ l
gGP2	3.58E+07	12.03	2.98E+06	0.05 $\mu$ l	0.005375 $\mu$ l	0.000538 $\mu$ l	0.000054 $\mu$ l
gGP30	2.33E+08	12.03	1.94E+07	0.01 $\mu$ l	0.000826 $\mu$ l	0.000083 $\mu$ l	0.000008 $\mu$ l

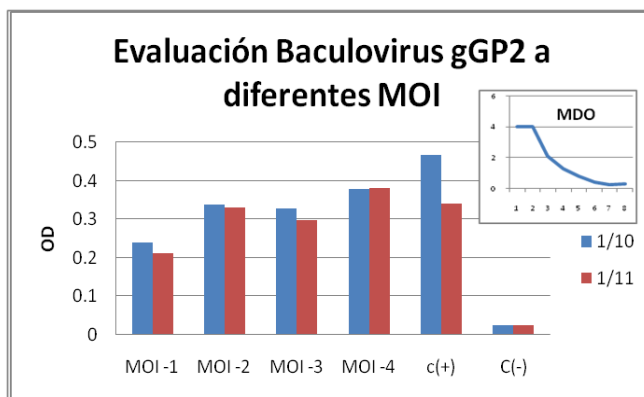
**Cuadro 9. Determinación de las infecciones controladas.** C.V: Copias virales, U.V: Unidades Virales, MOI: Multiplicidad de la Infección, gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, gGP2: glicoproteína G con el epítipo P2, gGP30: glicoproteína G con el epítipo P30.

#### 4.5.4. Evaluación de Infecciones a diferentes MOIs

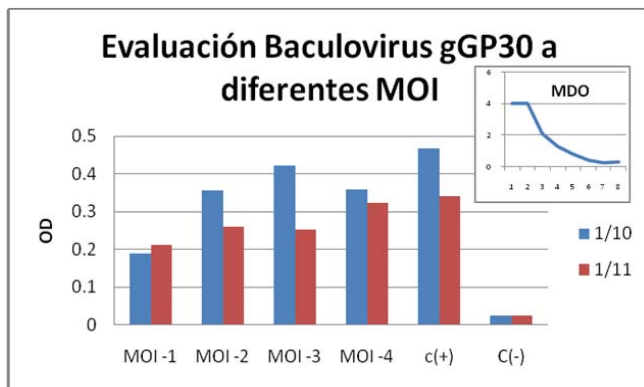
Para determinar cuáles eran las mejores MOI se evaluaron los sobrenadantes de las cuatro infecciones controladas. En la figura 17 se muestran los resultados de las diferentes infecciones controladas para cada construcción.



Construcción	Nº de copias/ $\mu$ l
gG Hist MOI -1	3.12E+08
gG Hist MOI -2	1.12E+08
gG Hist MOI -3	2.80E+05
gG Hist MOI -4	3.63E+06



Construcción	Nº de copias/ $\mu$ l
gG P2 MOI -1	1.84E+08
gG P2 MOI -2	1.70E+08
gG P2 MOI -3	2.51E+07
gG P2 MOI -4	1.61E+0



Construcción	Nº de copias/ $\mu$ l
gG P30 MOI -1	8.48E+05
gG P30 MOI -2	8.66E+05
gG P30 MOI -3	1.02E+06
gG P30 MOI -4	8.56E+06

**Figura 17. Reactividad antigénica y número copias virales de los baculovirus con diferentes MOI.** gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, gGP2: glicoproteína G con el epítipo P2, gGP30: glicoproteína G con el epítipo P30, C (+): Baculovirus que expresa glicoproteína G; C (-): Baculovirus expresa Proteína M de influenza, MDO: Máxima Densidad Óptica.

Podemos observar que los tres baculovirus se comportan de diferente manera en las infecciones controladas, para el baculovirus gGHist la mejor MOI fue la a la -2, mientras que en gGP2 es -4, y gGP30 no se encontró diferencia entre el MOI -1 y -3. Además no encontramos una relación entre el número de copias y la reactividad de los virus por ELISA.

#### 4.6 Evaluación de las vacunas recombinantes en pruebas de inmunización/desafío en ratones.

##### 4.6.1. Titulación del virus de la rabia.

Se titulo el virus de la rabia cepa CVS, por la técnica de Reed y Muench para determinar el número de dosis letales al 50% (DL50%), para utilizarlo en las pruebas de desafío. Los resultados se muestran en el cuadro 10.

Diluciones	Proporción	Muertos	Vivos	Acumulados Vivos	Acumulados Muertos	Total	Ratones Muertos (%)
$1 \times 10^{-1}$	6/6	6	0	0	33	33	100
$1 \times 10^{-2}$	7/7	7	0	0	27	27	100
$1 \times 10^{-3}$	7/7	7	0	0	20	20	100
$1 \times 10^{-4}$	7/7	7	0	0	13	13	100
$1 \times 10^{-5}$	6/7	6	1	1	6	7	14

Cuadro 10. Calculos de titulación viral por Reed y Muench.

Con estos resultados se realizó el cálculo para determinar el título viral.

$DL50\% = \text{Dilución mayor}$

$$> 50\% + \frac{(\% \text{ positivo arriba del } 50\%) - 50\%}{(\% \text{ positivos arriba del } 50\%) - (\% \text{ positivos abajo del } 50\%)} \times \log_{10} 10$$

$$DL50\% = 4 + \frac{100\% - 50\%}{100\% - 14\%} \times \log_{10} 10 = 4.58/0.03ml$$

$$DL50\% = 10^{4.58}/0.03ml = 10^{9.1}/ml$$

El virus de rabia cepa CVS utilizado en las pruebas de desafío obtuvo un título de  $10^{9.1}$  DL50%/ml. A partir de este título viral se determinaron las dosis letales para en los experimentos.

#### 4.6.2. Estandarización de las Dosis Letales al 50% y Vacuna de referencia.

Para contar con una vacuna de referencia la cual se pudiera utilizar como un control positivo en las pruebas de desafío y conocer el número de dosis letales 50% necesarias para evaluar los inóculos de inmunización, se inmunizaron ratones con una vacuna comercial y fueron desafiados con tres diferentes dosis letales (5, 25 y 50 DL50%) como se muestra en el protocolo descrito en material y métodos. En la cuadro 11 se muestra de forma cronológica el efecto del virus en los diferentes grupos de ratones a lo largo de 31 días de observación. En la figura

18 se ve de una manera grafica el número de sobrevivientes en los diferentes grupos al final del experimento.

Grupos	Días																			
	0	7	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
V. C./ 5 DL50%	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
V. C./ 25 DL50%	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	6	6	6	5
V. C./ 50 DL50%	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	3	3	2	2	2	2	2	2	2
V. 1/5 / 5 DL50%	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	6	6	6	6	6	6
V. 1/5 / 25 DL50%	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	5	5	5	5	5	5	5
V. 1/5 / 50 DL50%	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6
S. V./ 5 DL50%	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	6	5	2	0	0	0	0	0	0
S. V./ 25 DL50%	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	4	4	4	1	1	1	1	1	1	1
S. V./ 50 DL50%	7	7	7	7	7	7	7	7	7	6	5	5	2	1	1	1	1	1	1	1
S. V./ S. D.	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7

Cuadro 11. Cronograma de ratones sobrevivientes a la estandarización de las DL50% y Vacuna de referencia. Los ratones fueron inmunizados el día 0 y 7. El desafío fue en el día 14 con 25 DL50.VC: vacuna comercial dosis completa (sin dilución), V. 1/5: vacuna comercial dosis 1/5, S.V.: Sin Vacunar, DL50%: Dosis Letales al 50%, S.D.: Sin Desafío.

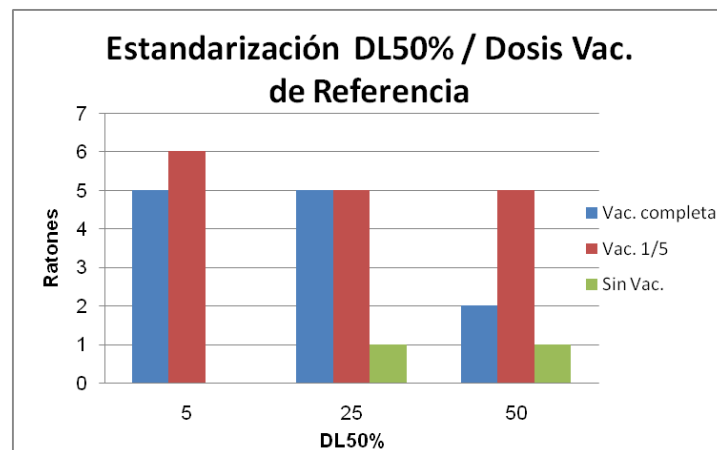


Figura18. Estandarización de dosis Letales 50% y vacuna de referencia. Ratones sobrevivientes: Vac. completa: vacuna comercial dosis completa, Vac 1/5: vacuna comercia dosis 1/5, Sin Vac.: Sin Vacunar, DL50%: Dosis Letales 50%.

Los resultados muestran que el virus empieza a causar efecto 9 dias posteriores a la inoculación, y que es efectivo en las tres dosis letales probadas ya que sólo

sobrevivieron dos ratones en el grupo control sin vacunar, uno en el desafiado con 25 DL50% y otro en el grupo de 5 DL50%.

Al analizar cual era la mejor dosis de inmunización, se observó que la vacuna en dilución 1/5 se comportó más estable que la vacuna en dosis completa, protegiendo a casi todos los ratones inmunizados en las diferentes DL50%.

Con estos resultados se determinó que las mejores condiciones para las pruebas de desafío son 25DL50% y el control positivo de inmunización para las pruebas es con la vacuna comercial en dilución 1/5.

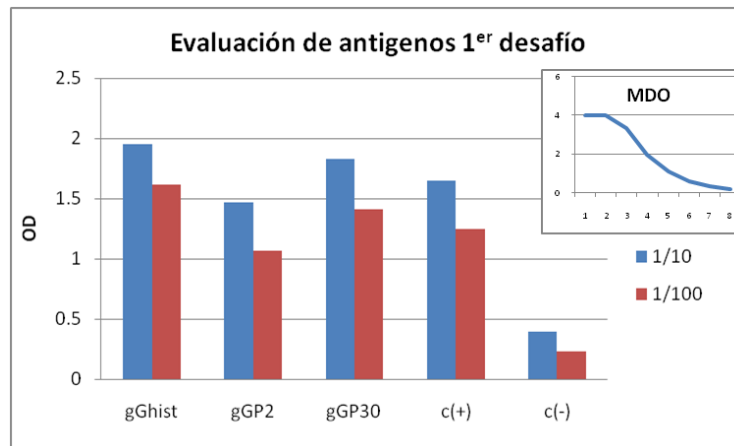
#### 4.6.3. Primer experimento de desafío.

Con las condiciones del desafío estandarizadas se realizó el primer experimento de desafío en el cual se probaron dos vías de inoculación intranasal (IN) e intraperitoneal (IP), y dos diferentes dosis. Previo a las inmunizaciones se evaluaron los antígenos por qPCR, ELISA y Bradford.

##### 4.6.3.1. Evaluación de antígenos primer desafío

En la figura 19 se muestra los niveles de expresión de la gG que tuvieron las tres construcciones en la prueba de ELISA. En el cuadro 12 se muestra la cantidad de proteína total y en los cuadros 13 se muestra el número de copias virales por qPCR.





**Figura 19. Reactividad antigénica de los inmunógenos 1er desafío.** ELISA sensibilizada con Baculovirus en diluciones 1/10 y 1/100 que expresan: gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, gGP2: glicoproteína G con el epítipo P2, gGP30: glicoproteína G con el epítipo P30, C (+): Baculovirus que expresa glicoproteína G; C (-): Baculovirus expresa Proteína M de influenza. Primer anticuerpo: suero hiperinmune de bovino contra el virus de la rabia en dilución 1/10; segundo anti cuerpo: Antibovino acoplado a peroxidasa en dilución 1:1000; revelado con OPD.

Proteína total 1er desafío	
Baculovirus	µg/µl
gGHist	1.546
gGP2	1.524
gGP30	1.554
Vac	4.158

**Cuadro 12. Concentración de proteína total 1er desafío.** Concentración de proteína determinada por el ensayo de Bradford de los antígenos recombinantes: gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, gGP2: glicoproteína G con el epítipo P2, gGP30: glicoproteína G con el epítipo P30.

Copias virales 1 <sup>er</sup> desafío	
Baculovirus	Nº de copias/ $\mu$ l
gGHist	5.43E+06
gGP2	6.16E+05
gG P30	4.25E+05

**Cuadro 13. Número de copias virales 1<sup>er</sup> desafío.** Baculovirus que expresan: gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, gGP2: glicoproteína G con el epítipo P2, gGP30: glicoproteína G con el epítipo P30.

Se puede observar que los tres baculovirus tiene una buena producción de gG, pero es mayor en las construcciones gGHist y gGP30 que nuestro control positivo. No se utilizó la vacuna comercial para evaluar los baculovirus debido a que los antígenos no se fijaban a la placa por contener hidróxido de aluminio como adyuvante.

Se determinó el número de copias virales para cada construcción por TrPCR utilizando una curva de cuantificación, sin encontrar gran diferencia entre el número de copias para cada baculovirus.

La cantidad de proteína total se cuantificó por el método de Bradford, como se pudo observar la proteína total fue menor en los baculovirus, sin embargo pensamos que las vacunas comerciales contienen diferentes detritos celulares, además de incluir las diferentes proteínas virales, en comparación con los Baculovirus que más del 80% de las proteínas totales son proteínas recombinantes, por estas razones se tomó la decisión de utilizar los estos baculovirus como inóculos de inmunización en el primer experimento de desafío.

#### 4.6.3.2. Evaluación de la capacidad inmuno-protectora en primera prueba de desafío

Para probar la capacidad inmuno-protectora de los Baculovirus recombinantes se probaron los tres inóculos, por dos vías de inmunización IP e IN, se realizaron ocho grupos de siete ratones cada uno, los resultados se muestran en el cuadro 14.

Grupos	Días																
	0	7	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Control (-) PBS	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0	0	0	1	1	1	1	1
Control (+) Vacuna 1/5	7	7	7	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
gGHist / IP	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	1	1	1	1	1
gGP2/IP	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	1	1	1	1	1
gGP30/IP	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0
gGHist / IN	7	7	7	7	7	7	7	7	7	1	1	1	0	0	0	0	0
gGP2/IN	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	2	2	2	2	2
gGP30/IN	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	1	0	0	0	0

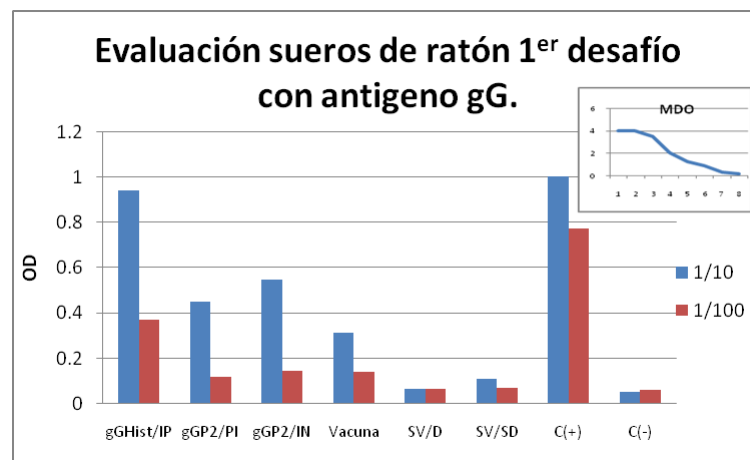
**Cuadro 14. Cronograma de ratones sobrevivientes al 1<sup>er</sup> experimento de desafío.** Los ratones fueron inmunizados el día 0 y 7. El desafío fue en el día 14 con 25 DL50.: gGHist/IP: glicoproteína G con cola de Histidinas por vía intraperitoneal, gGP2/IP: glicoproteína G con el epítipo P2 por vía Intraperitoneal, gGP30/IP: glicoproteína G con el epítipo P30 por vía Intraperitoneal, gGHist/IN: glicoproteína G con cola de Histidinas por vía intranasal, gGP2/IN: glicoproteína G con el epítipo P2 por vía Intranasal, gGP30/IN: glicoproteína G con el epítipo P30 por vía Intranasal, gGHist/IN: glicoproteína G con el epítipo P2 por vía Intranasal, c(+): Vacuna comercial diluida 1/5, c(-): PBS estéril.

Podemos observar que sólo sobrevivieron un total de 4 ratones en los 6 grupos de ratones inmunizados con baculovirus, el grupo control positivo vacunados con vacuna comercial sobrevivieron seis de siete ratones y en el grupo control negativo sobrevivió un ratón de siete del grupo. Dentro de los ratones inmunizados con baculovirus sobrevivieron tres ratones de la construcción gGP2, dos de ellos inmunizados por vía IN y uno por vía IP, y sólo sobrevivió un ratón del grupo

inmunizado con la construcción gGHist. los ratones de los demas no sobrevivieron al desafío.

#### 4.6.3.3. Evaluación de sueros de ratones primer desafío

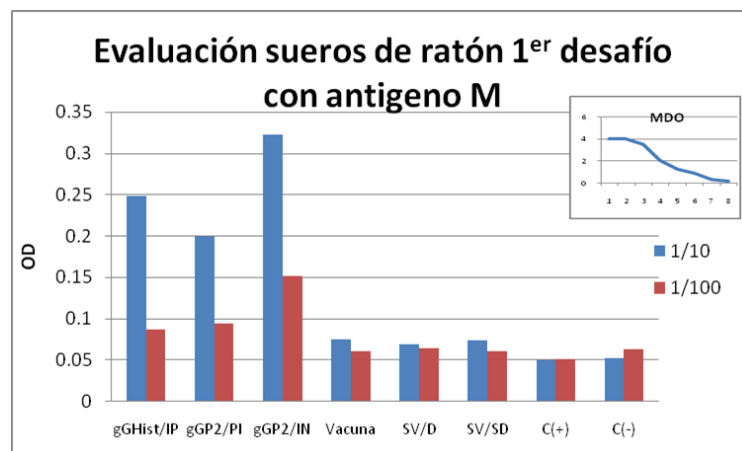
De los ratones sobrevivientes se evaluaron los sueros por el método de ELISA indirecta con el antígeno gG del virus de la rabia y la proteína M del virus de Influenza expresados en el sistema de baculovirus, esto nos permite medir la cantidad de anticuerpos producidos tanto para gG y los producidos por los baculovirus; en la figura 20 y 21 se muestran los resultados.



**Figura 20. Reactividad de sueros de ratones sobrevivientes con antígeno gG 1er desafío.** Sueros de ratones inmunizados con: gGHist/IP: glicoproteína G con cola de Histidinas por vía intraperitoneal, gGP2/IP: glicoproteína G con el epítipo P2 por vía Intraperitoneal, gGP2/IN: glicoproteína G con el epítipo P2 por vía Intranasal, Vacuna: Vacuna comercial diluida 1/5, SV/D: Sin vacunar/ Desafiado, SV/SD: Sin vacunar/Sin Desafío, c(+): suero de bovino positivo a rabia, c(-): suero fetal bovino negativo a rabia.

Como se puede observa en la gráfica de los sueros de los animales inmunizados con el baculovirus gGHist fueron los mas reactivos, obteniendo una reactividad muy parecida el control positivo, los animales que fueron inmunizados con el baculovirus gGp2 obtuvieron densidades ópticas (OD) muy similares, siendo un

poco mayor en el ratones inmunizados por vía intra-peritoneal, contrario a lo que se esperaba los sueros de los ratones inmunizados con la vacuna comercial tenían títulos más bajos que los demás ratones sobrevivientes. Con respecto al ratón sobreviviente sin inmunización la OD fue igual de baja que el control negativo y el suero de ratón sin vacunar y sin desafío, lo cual siguiere que fue una falla en el desafío.



**Figura 21. Reactividad de sueros de ratones sobrevivientes con antígeno M 1<sup>er</sup> desafío.** Sueros de ratones inmunizados con:gGHist/IP: glicoproteína G con cola de Histidinas por vía intraperitoneal, gGP2/IP: glicoproteína G con el epítipo P2 por vía Intraperitoneal, gGP2/IN: glicoproteína G con el epítipo P2 por vía Intranasal, Vacuna: Vacuna comercial diluida 1/5, SV/D: Sin vacunar/ Desafiado, SV/SD: Sin vacunar/Sin Desafío, c(+): suero de bovino positivo a rabia, c(-): suero fetal bovino negativo a rabia.

En la evaluación de los sueros con el antígeno Orf 7 de PRRS, las OD fueron bajas en todos los grupos, los que tenían mayor reactividad fueron los inmunizados con baculovirus, de estos el que tuvo mayor reactividad fue el grupo inmunizado con gGP2 por vía intra-nasal, por debajo de este grupo se encuentran los ratones inmunizados por vía intra-peritoneal gGP30 y gGP2. los otros grupos evaluados tuvieron una reactividad mínima.

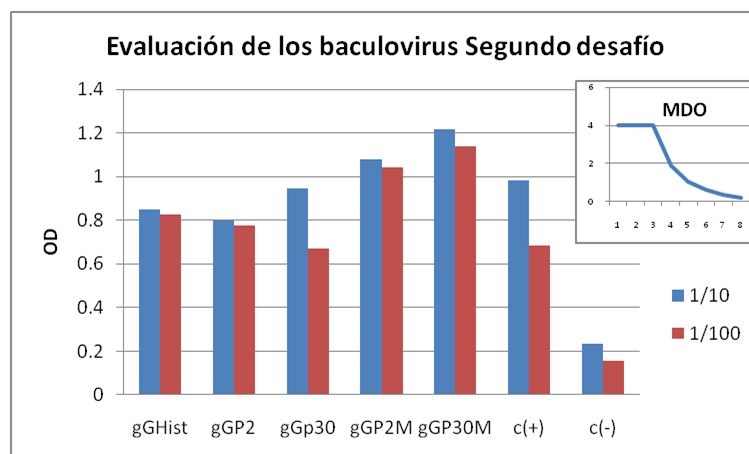
#### 4.6.4. Segundo experimento de desafío

Por los resultados obtenidos en el experimento anterior se decidió plantear el segundo experimento de desafío, utilizando sólo la vía de administración intraperitoneal, con la misma dosis pero ahora además de los tres baculovirus recombinantes del experimento anterior, se crecieron los baculovirus que expresan gG con el epítipo P2 y P30 con un baculovirus que expresa la proteína M de influenza, cuya construcción se tenía previamente en el laboratorio, esto con la intención de formar partículas parecidas a virus y tener una mejor respuesta inmunológica.

En el Anexo 1 se muestra el protocolo que se utilizó para este experimento, en el cual se evaluarán nueve grupos incluyendo un control positivo (inmunizado con vacuna comercial) y un control negativo (inoculado con PBS), de siete ratones cada uno.

##### 4.6.4.1. Evaluación de antígenos segunda desafío

La evaluación de los antígenos para el segundo experimento de desafío, se realizó al igual que en el experimento anterior por ELISA indirecta para medir el nivel de expresión de los antígenos, técnica de Bradford para cuantificar la cantidad de proteína total y PCR cuantitativa evaluar el número de copias virales, en la figura 22 y cuadros 15 y 16 se muestran los resultados.



**Figura 22. Reactividad antigénica de los inmunógenos 2º desafío.** Reactividad antigénica de los inmunógenos. ELISA sensibilizada con Baculovirus en diluciones 1/10 y 1/100 que expresan: gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, gGP2: glicoproteína G con el epítipo P2, gGP30: glicoproteína G con el epítipo P30, gGP2+M: glicoproteína G con el epítipo P2 y la proteína M de influenza, gGP30+M: glicoproteína G con el epítipo y la proteína M de influenza. C (+): Baculovirus que expresa glicoproteína G; C (-): Baculovirus expresa Proteína M de influenza. Primer anticuerpo: suero hiperinmune de bovino contra el virus de la rabia en dilución 1/10; segundo anti cuerpo: Antibovino acoplado a peroxidasa en dilución 1:1000; revelado con OPD.

En la prueba de ELISA se pudo observar que todos los baculovirus tuvieron una reactividad mayor a 1.2 OD, siendo los Baculovirus combinado gGP2M-gGP30M los que tuvieron mayor reactividad, incluso mayor que el control positivo.

Proteína total 2º desafío	
Baculovirus	µg/µl
gGHist	1.587
gGP2	1.527
gGP30	1.473
gGP2M+gGP30M	1.654
Vac	4.158

**Cuadro 15. Concentración de proteína total 2º desafío.** Concentración de proteína determinada por el ensayo de Bradford de los antígenos recombinantes. : gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, gGP2: glicoproteína G con el epítipo P2, gGP30: glicoproteína G con el epítipo P30, gGP2M+gGP30M: glicoproteína G con el epítipo P2 y la proteína M de influenza, más la glicoproteína G con el epítipo P30 y la proteína M de influenza.

La cantidad de proteína total, al igual que en el experimento anterior todos los baculovirus tenían al rededor de 1.5µg/µl, en comparación con la cantidad de proteína total de la vacuna comercial que es casi tres veces la concentración que los baculovirus (4.2 µg/µl).

Copias virales 2º desafío	
Baculovirus	Nº de copias/µl
gGHist	3.42E+03
gGP2	7.66E+03
gG P30	2.94E+04
gGP2M	7.52E+05
gGP30M	1.09E+06

**Cuadro 16. Número de copias virales 2º desafío.** Baculovirus que expresan: gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, gGP2: glicoproteína G con el epítipo P2, gGP30: glicoproteína G con el epítipo P30, gGP2+M: glicoproteína G con el epítipo P2 y la proteína M de influenza, gGP30+M: glicoproteína G con el epítipo y la proteína M de influenza.

Al determinar el número de copias virales por Q-PCR se observa que todos los baculovirus se propagaron, teniendo un mayor crecimiento viral en los baculovirus que incluían la proteína M.

#### 4.6.4.2. Evaluación de la capacidad inmuno-protectora segunda prueba de desafío.

Para evaluar la capacidad inmuno-protectora de los inóculos se formaron nueve grupos de siete ratones cada uno incluyendo el control positivo y control negativo, estos fueron administrados por vía intraperitoneal. En el cuadro 17 se muestran los resultados obtenidos en la prueba de desafío.

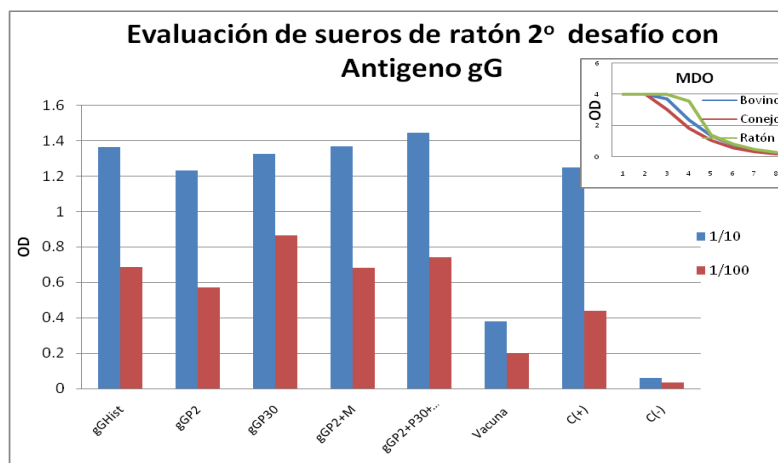


Grupos	Días																
	0	7	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Control (-) PBS	7	7	7	7	7	6	6	6	6	0	0	0	0	0	0	0	0
Control (+) Vacuna 1/5	7	7	7	6	6	6	6	6	6	6	6	6	5	5	5	5	5
gGHist	7	7	7	7	7	7	7	7	6	1	1	1	1	1	1	1	1
gGP2	7	7	7	7	7	7	7	7	5	0	0	0	0	0	0	0	0
gG P30	7	7	7	7	7	7	6	6	4	4	2	2	2	2	2	2	2
gGP2 + P30	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0
gGp2M	7	7	7	7	7	7	7	7	7	7	1	1	1	1	1	1	1
gGP30M	7	7	7	7	7	7	7	7	7	0	0	0	0	0	0	0	0
gGP2M +P30M	7	7	7	7	7	7	7	7	7	1	1	1	1	1	1	1	1

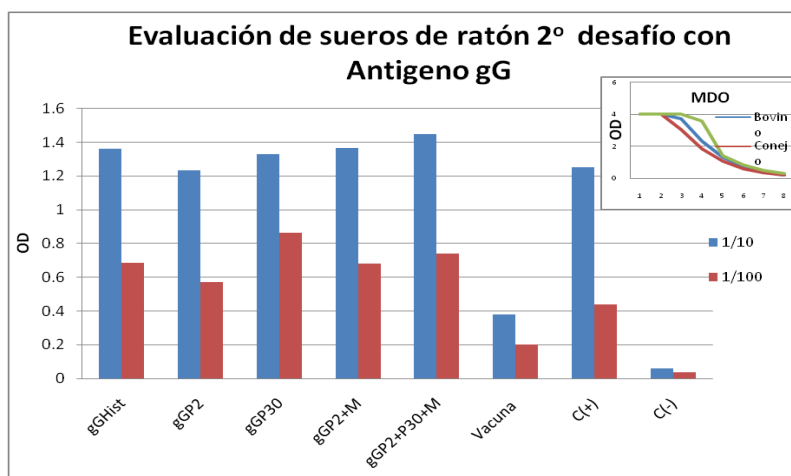
**Cuadro 17. Cronograma de ratones sobrevivientes al 2º experimento de desafío.** Los ratones fueron inmunizados el día 0 y 7. El desafío fue en el día 14 con 25 DL50 gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, gGP2: glicoproteína G con el epítipo P2, gGP30: glicoproteína G con el epítipo P30, gGP2+gGP30: glicoproteína G con epítipo P2 y glicoproteína G con epítipo P30, gGP2M: glicoproteína G con el epítipo P2 y la proteína M de influenza, gGP30M: glicoproteína G con el epítipo y la proteína M de influenza, control (+): Vacuna comercial diluida 1/5, control (-): PBS estéril.

#### 4.6.4.3. Evaluación de sueros de ratones segundo desafío

Los sueros de los ratones sobrevivientes al desafío fueron evaluados por la técnica de ELISA indirecta para evaluar la producción de anticuerpos después de la inmunización. Los sueros fueron evaluados sensibilizando placas con el antígeno gG del virus de la rabia y el Orf7 del virus de PRRS ambos expresados en un sistema de Baculovirus comercial, cuyas construcciones se tenían previamente en el laboratorio. Los resultados se muestran en las figuras 23 y 24.



**Figura 23. Reactividad de sueros de ratones sobrevivientes con antígeno gG 2º desafío.** Sueros de ratones inmunizados con: Vacuna: Vacuna en dilución 1/5, y los Baculovirus que expresan; gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, gGP2: glicoproteína G con el epítipo P2, gGP30: glicoproteína G con el epítipo P30, gGP2+M: glicoproteína G con el epítipo P2 y la proteína M de influenza, gGP30+M: glicoproteína G con el epítipo y la proteína M de influenza. C(+): Suero hiperinmune de bovino contra el virus de la rabia, C(-): suero de bovino negativo al virus de la rabia.



**Figura 24. Reactividad de sueros de ratones sobrevivientes con antígeno M de influenza 2º desafío.** Sueros de ratones inmunizados con: Vacuna comercial en dilución 1/5, y los Baculovirus que expresan; gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, gGP2: glicoproteína G con el epítipo P2, gGP30: glicoproteína G con el epítipo P30, gGP2+M: glicoproteína G con el epítipo P2 y la proteína M de influenza, gGP30+M: glicoproteína G con el epítipo y la proteína M de influenza. C(+): Suero hiperinmune de bovino contra el virus de la rabia, C(-): suero de bovino negativo al virus de la rabia.

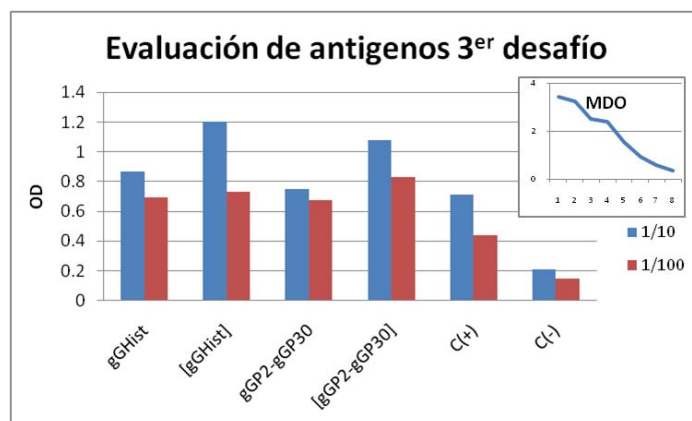
Podemos observar que los sueros de los ratones tuvieron muy buena reactividad al ser evaluados con el antígeno gG del virus de la rabia, teniendo densidades similares en los cuatro grupos de ratones sobrevivientes (alrededor de 1.3 a 1.5 OD), y al igual que en el experimento anterior los sueros de los ratones inmunizados con la vacuna comercial presentan una reactividad baja, sin embargo tiene una inmunidad protectora.

#### 4.6.5. Tercer experimento de desafío

Considerando los resultados obtenidos en los dos experimentos anteriores, se tomó la decisión de incluir adyuvantes en los inóculos y se aumentó la concentración de los baculovirus para tener una mejor respuesta inmunológica; además se inocularon juntos los baculovirus recombinantes gGP2 y gGP30. El protocolo utilizado para este desafío se muestra en el Anexo 2.

##### 4.6.5.1. Evaluación de antígenos tercer experimento de desafío

Los antígenos para el tercer desafío fueron evaluados para medir su reactividad por ELISA, para medir el número de copias virales Q-PCR y para medir la cantidad de proteína total se realizó con la técnica de Bradford. Los resultados se muestran en la figura 25, y los cuadros 18 y 19.



**Figura 25. Reactividad antigénica de los inmunógenos 3<sup>er</sup> desafío.** ELISA sensibilizada con Baculovirus en diluciones 1/10 y 1/100 que expresan: gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, [gGHist]: glicoproteína G con cola de Histidinas concentrado, gGP2 - gGP30: glicoproteína G con epítipo P2 y glicoproteína G con epítipo P30, [gGP2 - gGP30]: glicoproteína G con epítipo P2 y glicoproteína G con epítipo P30 concentrado, C (+): Baculovirus que expresa glicoproteína G; C (-): Baculovirus expresa Proteína M de influenza. Primer anticuerpo: suero hiperinmune de bovino contra el virus de la rabia en dilución 1/10; segundo anti cuerpo: Antibovino acoplado a peroxidasa en dilución 1:1000; revelado con OPD.

En la evaluación de la reactividad de los inóculos se puede observar que todos los baculovirus tuvieron una reactividad mayor que el control positivo, teniendo mayor reactividad los baculovirus concentrados, de estos dos el gGHist fue el de mayor reactividad.

Proteína total 3 <sup>er</sup> desafío	
Baculovirus	µg/µl
gGHist	1.665
[gGHist]	6.099
gGP2-gGP30	1.654
[gGP2-gGP30]	6.099
Vac	6.944

**Cuadro 18. Concentración de proteína total 3<sup>er</sup> desafío.** Concentración de proteína determinada por el ensayo de Bradford de los antígenos recombinantes. : gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, [gGHist]: gGHist concentrado, gGP2 - gGP30: glicoproteína G con epítipo P2 y glicoproteína G con epítipo P30, [gGP2 - gGP30]: glicoproteína G con epítipo P2 y glicoproteína G con epítipo P30 concentrado.

Al evaluar la cantidad de proteína total los baculovirus concentrados tuvieron 6µg/µl de proteína muy similar a la concentración de proteína que tiene la vacuna comercial (6.9 µg/µl). Los baculovirus sin concentrar tuvieron una concentración similar a los evaluados en los experimentos anteriores (1.5 µg/µl).

Copias virales 3 <sup>er</sup> desafío	
Baculovirus	Nº de copias/µl
gGHist	4.312E+04
[gGHist]	1.036E+06
gGP2-gGP30	4.306E+04
[gGP2-gGP30]	5.43E+06

**Cuadro19. Número de copias virales 3<sup>er</sup> desafío.** Baculovirus que expresan: gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, [gGHist]: glicoproteína G con cola de Histidinas concentrado, gGP2 - gGP30: glicoproteína G con epítipo P2 y glicoproteína G con epítipo P30, [gGP2 - gGP30]: glicoproteína G con epítipo P2 y glicoproteína G con epítipo P30 concentrado.

Al determinar el número de copias virales por Q-PCR, los baculovirus no concentrados se comportaron similar a los experimentos anteriores, y los baculovirus concentrados tuvieron valores muy similares a los crecimientos de los baculovirus con la proteína M del virus de influenza. Con estos valores se ajusto la dosis para cada grupo de ratones.

#### 4.6.5.2. Evaluación de la capacidad inmuno-protectora tercer prueba de desafío.

Para la evaluación de la capacidad inmuno-protectora, se formaron 14 grupos de 5 ratones cada uno incluyendo los controles positivo y negativo, el protocolo que se utilizo para el desafío se muestra en el Anexo 2. Los resultados se muestran en cuadro 20 y en la figura 26.

Grupos	Días																
	0	7	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
Control (-) PBS	5	5	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0
Control (+) Vacuna 1/5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
gGP2-gGP30	5	5	5	5	5	5	5	5	4	2	2	0	0	0	0	0	0
[gGP-gG2P30]	5	5	5	5	5	5	5	5	4	2	2	0	0	0	0	0	0
gGP2P30 + Al(OH)3	5	5	5	5	5	5	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
[gGP-gG2P30] + Al(OH)3	5	5	5	5	5	5	5	5	4	1	1	1	1	1	1	1	1
gGHist	5	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
[gGHist]	5	5	5	5	5	5	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gGHist + Al(OH)3	5	5	5	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
[gGHist] + Al(OH)3	5	5	5	5	5	5	4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
gGP2-gGP30 + Inf $\alpha$	5	5	5	5	5	5	5	5	4	1	0	0	0	0	0	0	0
[gGP2P30] + Inf $\alpha$	5	5	5	5	5	5	5	5	4	1	1	1	1	1	1	1	1
gGHist + Inf $\alpha$	5	5	5	5	5	5	5	5	3	1	1	1	1	1	1	1	1
[gGHist] + Inf $\alpha$	5	5	5	5	5	5	5	5	3	0	0	0	0	0	0	0	0

**Cuadro 20. Cronograma de ratones sobrevivientes al 3<sup>er</sup> experimento de desafío.** Los ratones fueron inmunizados el día 0 y 7. El desafío fue en el día 14 con 25 DL50% gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, [gGHist]: glicoproteína G con cola de Histidinas concentrado, gGP2 - gGP30: glicoproteína G con epítipo P2 y glicoproteína G con epítipo P30, [gGP2 - gGP30]: glicoproteína G con epítipo P2 y glicoproteína G con epítipo P30 concentrado. Adyuvantes: Al(OH)3: Hidróxido de aluminio; Inf  $\alpha$ : interferon  $\alpha$

En el cuadro podemos observar que el virus empleado para el desafío empieza a causar efecto al sexto día posterior a la inoculación del virus. sólo sobrevivieron tres ratones que fueron inmunizados con baculovirus todos los ratones inmunizados con vacuna comercial sobrevivieron al desafío y todos los ratones del control negativo inoculado con PBS no sobrevivieron al desafío.

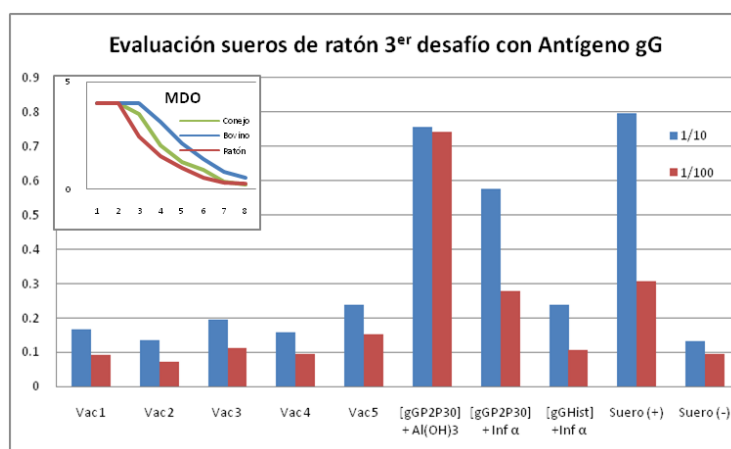


**Figura 26. Ratones sobrevivientes al 3er experimento de desafío.** Ratones inmunizados con los Baculovirus que expresan: gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, [gGHist]: glicoproteína G con cola de Histidinas concentrado, gGP2 - gGP30: glicoproteína G con epítipo P2 y glicoproteína G con epítipo P30, [gGP2 GP30]: glicoproteína G con epítipo P2 y glicoproteína G con epítipo P30 concentrado. Adyuvantes: Al(OH)3: Hidróxido de aluminio; Inf α: interferon α.

Los tres ratones sobrevivientes al desafío pertenecían a tres grupos de ratones diferentes, dos de ellos fueron inmunizados con gGP2-gGP30 en con una dosis alta, pero con diferente adyuvante. el tercer ratón sobre viviente fue el inmunizado con gGHist dosis normal con el segundo adyuvante.

#### 4.6.5.3. Evaluación de los sueros de ratones sobrevivientes tercer desafío.

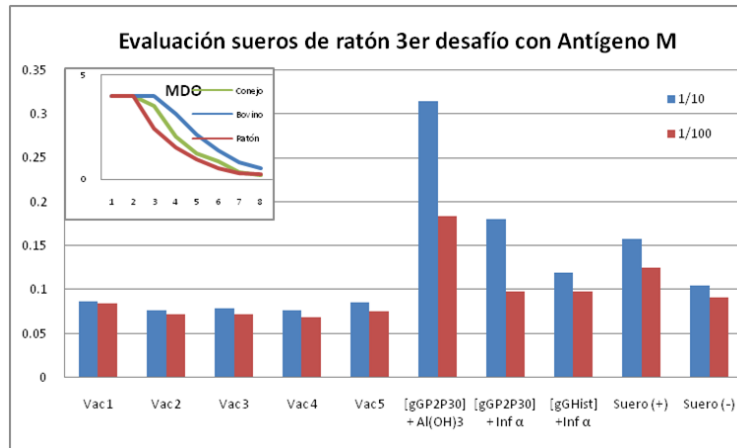
Los sueros de ratón fueron evaluados por ELISA indirecta con el antígeno gG del virus de la rabia y el antígeno M del virus de influenza expresado en un sistema de baculovirus, para evaluar la producción de anticuerpos dirigidos a la gG de rabia y los anticuerpos contra las proteínas de los Baculovirus. Los resultados se muestran en las Figuras 27 y 28.



**Figura 27. Reactividad de sueros de ratones sobrevivientes con antígeno gG 3<sup>er</sup> desafío.** Sueros de ratones inmunizados con los Baculovirus que expresan: Vac: Vacuna comercial diluida 1/5 [gGHist]: glicoproteína G con cola de Histidinas concentrado, [ gGP2 - gGP30 ] : glicoproteína G con el epítipo P2 y glicoproteína G con el epítipo P30 concentrado. Adyuvantes: Al(OH)<sub>3</sub>: Hidróxido de aluminio; Inf α: interferon α

Al evaluar los sueros de ratón con el antígeno gG de rabia podemos observar que los sueros de ratones inmunizados con la vacuna comercial la reactividad no supera las 0.25 OD, en cambio los ratones inmunizados con los baculovirus recombinados tuvieron una reactividad de hasta 0.75 OD, muy similar a la obtenida por el suero control positivo.





**Figura 28. Reactividad de sueros de ratones sobrevivientes con antígeno M 3<sup>er</sup> desafío.** Sueros de ratones inmunizados con los Baculovirus que expresan: Vac: Vacuna comercial diluida 1/5 [gGHist]: glicoproteína G con cola de Histidinas concentrado, [ gGP2 - gGP30] : glicoproteína G con el epítipo P2 y glicoproteína G con el epítipo P30 concentrado. Adyuvantes: Al(OH)3: Hidróxido de aluminio; Inf α: interferon α

Al evaluar los sueros con el antígeno M de influenza observamos que las reactividades son menores a las obtenidas con con el antígeno gG de rabia. Los sueros de los ratones inmunizados con la vacuna comercial practivamente no tiene reactividad, en cambio los ratones inmunizados con los baculovirus recombinates tiene reactividad de hasta 0.35 OD.

## V. Discusión

En este trabajo, se obtuvieron tres construcciones moleculares de la glicoproteína G del virus de la rabia: la gG con el epitopo P2 de la toxina tetánica y la gG con el epitopo P30 de la misma toxina. Estas construcciones fueron movilizadas al genoma de baculovirus mediante el sistema de baculovirus Bac to Bac®. los cuales fueron evaluados en tres experimentos de inmunización/desafío.

Las modificaciones que se realizaron a la gG fueron hechas por PCR, utilizando iniciadores diseñados para clonar el gen completo, esto represento incluir en la secuencia, además de los sitios de corte BamHI, el péptido señal en el extremo 5' y las secuencias de los péptidos P2 y P3. El iniciador reverso incluyó la secuencia de 6 histidinas. La clonación fue realizada empleando el sitio BamHI en el vector pFastBac. Fue necesario evaluar la orientación de la clonación, esto fue realizado empleando PCR un iniciador en el inserto y otro en el vector. Se ha descrito el empleo de sitios NcoI y XhoI para realizar inserción dirigida en el vector del baculovirus (Imène *et al.* 2014).

Para la obtención de los bacmidos recombinantes, se realizó una primera clonación en un vector T, posteriormente se realizó una digestión con la enzima BamHI para recuperar el inserto asegurando la presencia en los fragmentos de sitios BamHI cohesivos. Estos fragmentos se clonaron en el vector de movilización pFastBac. Esta metodología fue utilizada también por QIAN *et al.* 2006, para generar baculovirus recombinantes de SARS, estos investigadores utilizaron el mismo sistema de expresión, pero bajo el promotor de la proteína gP64 del baculovirus.

La transfección con el ADN de los bacmidos recombinantes se realizó en células de insecto SF9, línea celular que en la mayoría de los trabajos publicados emplean para la producción de baculovirus, y obteniendo el sobrenadante a los cuatro días postransfección como lo realizado por Abe *et al.* 2014, Feng *et al.* 2006; Fu *et al.* 1991; y Kost y Condreay 1999. En cada una de estas publicaciones utilizan diferentes multiplicidades de la infección, pero coinciden en el empleo de MOI 1, como lo que sugiere Drugmand *et al.* 2012, para una mejor producción de baculovirus recombinantes. En este trabajo se utilizaron MOI de 0.1 a 0.3 para la propagación viral. MOI's bajas (10<sup>-3</sup>) han sido encontradas eficientes para la propagación de baculovirus recombinantes. Diferentes MOI's fueron evaluadas experimentalmente

La evaluación del nivel de expresión de la glicoproteína G del virus de la rabia en los baculovirus se realizó por la técnica de ELISA, sensibilizando la placa de titulación con el sobrenadante de la infección y revelando con un suero de bovino control positivo. Este suero fue obtenido experimentalmente Feng *et al.* 2006 y Kim y Chang 2012, evaluaron la expresión de las proteínas recombinantes mediante la purificación de los baculovirus recombinantes en gradiente de sacarosa y la expresión de proteínas fue confirmada por western blot.

En este trabajo se desarrolló la titulación de baculovirus por PCR cuantitativa (Q-PCR) detectando la secuencia genética que amplifica para la proteína gp-64 de los baculovirus. Se estandarizó la cuantificación del baculovirus correlacionando el número de moléculas virales con el título viral medido in-vitro por la prueba de

viabilidad con MTT. La cuantificación por qPCR ha sido descrita con anterioridad por George et al. 2012, los cuales utilizaron el qPCR amplificando el gen gp-64.

Las pruebas de desafío se realizaron de acuerdo a lo señalado por Seligmann 1973 para la Prueba de Potencia NIH, en este trabajo estandarizamos las condiciones de desafío a 25 DL50% en 0.03ml, valor que está dentro del rango que señala dicha prueba. La literatura reporta el uso de 10, 20 y 50 DL50% (Yin et al. 2012, Fu et al. 1991 y Wu et al. 2014) y en estos estudios el desafío se realizó a los 30 días, posteriores a la primera inmunización.

Los experimentos de desafío se realizaron de acuerdo a lo recomendado por Seligmann 1973, y similar a lo realizado por Fujii et al. 1994, Huang et al. 2011, Yin et al. 2013 y Wu et al. 2014, los cuales probaron la capacidad inmunoprotectora de los baculovirus.

Fujii et al. 1994 comparó la capacidad inmunoprotectora de la nucleoproteína (N) y la gG del virus de la rabia expresadas en baculovirus, realizando dos tipos de experimentos, uno inmunizando para una prueba de desafío viral y otro como inmunización post- desafío. Se obtuvieron 100% de sobrevivientes en el primer experimento para los baculovirus que expresan la gG del virus de la rabia y 92% para la proteína N utilizando como inmunógeno  $10^7$  unidades formadoras de placa (UFP). Para el experimento post-exposición al virus de desafío CVS la gG induce una protección mayor al 80% si la vacuna se aplica antes de las 24 horas de la

infección, mientras que los baculovirus que expresan la proteína N no inducen protección.

Huang *et al.* 2011 modificaron el vector pFastBac del sistema Bac to bac para la expresión de la gG del virus de la rabia con el promotor de citomegalovirus para la expresión de proteínas en células de mamíferos, bajo el control del promotor de gen gP64 se expresó la glicoproteína B del virus de la estomatitis vesicular (VSV) como un adyuvante ya que induce altos niveles de de inmunidad humoral y celular. Ellos obtuvieron altos niveles de anticuerpos específicos neutralizantes contra el virus de la rabia, pero afirman que esto depende de la dosis utilizada en la inmunización, que en su caso fue utilizando  $10^9$  UFP.

Yin *et al.* 2013, construyeron un baculovirus recombinante que expresa la proteína N de virus de la rabia. Los baculovirus recombinantes fueron propagados en gusano de seda y la proteína N fue purificada para la inmunización de ratones para evaluar el título de anticuerpos específicos por medio de ELISA indirecta, teniendo títulos similares a los obtenidos por la vacuna comercial. En la prueba de desafío inmunizaron a los ratones con  $10\mu\text{g}$  de purificado de gusano de seda en dos ocasiones en el día 1 y el día 7 posterior a la primera inmunización, por vía intramuscular, y el desafío se realizó al día 14 después de la primera inmunización y los ratones fueron evaluados por 14 días, ellos obtuvieron resultados alentadores, ya que el 90% de los ratones inmunizados con el purificado sobrevivieron al desafío, comparado con el 100% de sobrevivientes con la vacuna comercial. La cantidad de proteína recombinante obtenida por larva fue 5mg.

En las pruebas de desafío, como lo realizó Wu *et al.* 2014 utilizando el sistema BAC to BAc duo, en cual realizaron tres construcciones uno expresando la glicoproteínas del virus de la estomatitis vesicular (VSVG) y la proteína verde fluorescente (EGFP), la segunda expresando la VSVG y la gG del virus de la rabia, y la tercera construcción la gG del virus de la rabia en los dos sitios de clonación del vector, y utilizaron como control negativo PBS. ellos encontraron 100% de protección en los Baculovirus que expresan la gG del virus de la rabia en los dos sitios de clonación. Utilizado  $1 \times 10^8$  Unidades infecciosas por ml, e inmunizados por vía intra muscular.

Con la finalidad de determinar la mejor vía de inmunización, en el primer experimento de desafío se utilizaron: la vía intranasal y la vía intraperitoneal, sin embargo no se encontró una diferencia significativa entre las dos vías de administración.

La elección de la vía intraperitoneal fue considerada ya que la prueba de potencia de NIH (Seligmann 1973) emplea la vía intraperitoneal para la evaluación de las vacunas contra rabia. Estaba de administración del inmunógeno fue empleada para todos los experimentos de desafío en el estudio. Sin embargo hay que considerar que la mayoría de los artículos revisados reportan la vía intra muscular para la administración de los inóculos.

En comparación a los experimentos de desafío revisados, en este proyecto no purificamos los baculovirus, pensando que los baculovirus cosechados podrían inducir inmuno-protección sin ningún paso intermedio.

Después de los resultados negativos consideramos en el tercer desafío concentrar los baculovirus para aumentar la dosis de inóculo esperando observar protección. Un punto crítico que nos faltó evaluar fue la comparación entre el número de copias virales con las UFP, ya que nos permitiría comparar los resultados obtenidos por otros investigadores.

Debido a los resultados obtenidos en la primera prueba de desafío, se decidió incorporar el uso de adyuvantes para promover la respuesta inmune. Se decidió probar dos adyuvantes, hidróxido de Aluminio (Rehydrigel LV®) e Interferón alfa (INF- $\alpha$ ). El hidróxido de aluminio es el más utilizado por las vacunas comerciales incluyendo el virus de la rabia. Este adyuvante se ha empleado por cerca de 90 años (Glenny et al. 1926) y se ha utilizado en vacunas tanto para humanos como para animales (Baylor et al. 2001).

El INF- $\alpha$  es un adyuvante que se ha empleado recientemente como lo demuestran Cheng *et al.* 2007, utilizándolo como adyuvante en vacunas subunitarias contra el virus de la fiebre aftosa en porcinos, induciendo citoquinas inflamatorias, en donde los animales inmunizados con este adyuvante y la proteína recombinante no mostraron signos de enfermedad.

Al evaluar los sueros de los ratones sobrevivientes al desafío por la prueba de ELISA, se obtuvieron densidades ópticas mayores en los ratones inmunizados con los baculovirus recombinates a los obtenidos por los ratones que fueron inmunizados con la vacuna comercial, contrario a lo observado por Yin *et al.* 2013, el cual tuvo títulos de anticuerpos similares entre animales inmunizados con vacuna comercial y con baculovirus recombinates. Para evaluar que los anticuerpos producidos por los ratones inmunizados con los baculovirus recombinates fueran específicos contra la gG del virus de la rabia y no contra proteínas de los baculovirus, se evaluaron los sueros por ELISA, con baculovirus recombinates que expresan la proteína M del virus de influenza o el ORF 7 del virus de PRRS, obteniendo títulos muy bajos.



## **VI. Conclusiones**

Los objetivos planteados en este trabajo se cubrieron satisfactoriamente, se logró construir y propagar tres baculovirus recombinantes que expresan la gG del virus de la rabia, y la gG quimérica con los epitopos P2 y P30..

Se realizó la evaluación y caracterización de los baculovirus recombinantes en cada etapa de la propagación y previo a cada experimento de desafío.

Se evaluó la capacidad inmuno-protectora de los baculovirus recombinantes en tres pruebas de desafío, teniendo resultados desfavorables en los tres ensayos para las tres construcciones. Sin embargo el proyecto es muy extenso y se requiere profundizar más en el tema, ya que existe investigaciones al respecto que prueban que los baculovirus son eficientes como vehículos de inmunización.

## VII. Bibliografía

- Abe, T., Takahashi, H., Hamazaki, H., Miyano-Kurosaki, N., Matsuura, Y., & Takaku, H. (2003). Baculovirus induces an innate immune response and confers protection from lethal influenza virus infection in mice. *The Journal of Immunology*, 171(3), 1133-1139.
- Aoki, H., Sakoda, Y., Jukuroki, K., Takada, A., Kida, H., & Fukusho, A. (1999). Induction of antibodies in mice by a recombinant baculovirus expressing pseudorabies virus glycoprotein B in mammalian cells. *Veterinary microbiology*, 68(3), 197-207.
- Ayres, M. D., Howard, S. C., Kuzio, J., Lopez-Ferber, M., & Possee, R. D. (1994). The Complete DNA Sequence of *Autographa californica* Nuclear Polyhedrosis Virus. *Virology*, 202(2), 586-605.
- Bai, B., Lu, X., Meng, J., Hu, Q., Mao, P., Lu, B., ... & Wang, H. (2008). Vaccination of mice with recombinant baculovirus expressing spike or nucleocapsid protein of SARS-like coronavirus generates humoral and cellular immune responses. *Molecular immunology*, 45(4), 868-875.
- Baylor, N. W., Egan, W., & Richman, P. (2002). Aluminum salts in vaccines—US perspective. *Vaccine*, 20, S18-S23.
- Belotto, A., Leanes, L. F., Schneider, M. C., Tamayo, H., & Correa, E. (2005). Overview of rabies in the Americas. *Virus research*, 111(1), 5-12.

- Bishop, D.H.L., Entwistle, P.P., Cajvieron, I.R., Allen, C.J., and Possee, R.D. (1988). Field trial of genetically engineered baculovirus insecticides. In *The Release of Genetically Engineered Organisms*. M. Sussman, C.H. Collins, F.A. Skinner, and D.E. Stewart- Tull, eds. (Academic Press, London), pp. 143-179.
- Blissard, G. W., B. Black, N. Crook, B. A. Keddie, R. Possee, G. F. Rohrmann, D. A. Theilmann, and L. Volkman. 2000. Family Baculoviridae, p. 195-202. In M. H. V. Van Regenmortel et al. (ed.), *Virus taxonomy: seventh report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press, San Diego, Calif.
- Bruner, D. W., and Gillespie, J. H. (1973). XLVII, Rabies and other rhabdoviroses. In: *Hagan's Infectious of Domestic Anima*. Cornell University Press, Ithaca. pp. 1144-1170.
- Brzózka, K. (2006). The rabies virus phosphoprotein P: a key regulator of innate immune responses (Doctoral dissertation, Imu).
- Carstens, E. B. (2009). AcMNPV as a model for baculovirus DNA replication. *Virologica Sinica*, 24(4), 243-267.
- CENAVECE, Ministry of Health, Mexico. Guía para la atención médica y antirrábica de la persona expuesta al virus de la rabia. <http://www.cenavece.salud.gob.mx/programas/descargas/pdf/guiatxrab.pdf>.

- Chen, C. Y., Lin, C. Y., Chen, G. Y., & Hu, Y. C. (2011). Baculovirus as a gene delivery vector: recent understandings of molecular alterations in transduced cells and latest applications. *Biotechnology advances*, 29(6), 618-631.
- Cheng, G., Zhao, X., Yan, W., Wang, W., Zuo, X., Huang, K., ... & Zheng, Z. (2007). Alpha interferon is a powerful adjuvant for a recombinant protein vaccine against foot-and-mouth disease virus in swine, and an effective stimulus of in vivo immune response. *Vaccine*, 25(28), 5199-5208.
- Coll, J. M. (1995). The glycoprotein G of rhabdoviruses. *Archives of virology*, 140(5), 827-851.
- Conzelmann, K. K., Cox, J. H., Schneider, L. G., & Thiel, H. J. (1990). Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology*, 175(2), 485-499.
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(12), 6640-6645.
- Dominguez, J., Vargas, L. F., Lecuona, A., & Legaspi, T. (1998). Comportamiento epidemiológico de la rabia humana en México. In *Proceedings of the 9th International Meeting on Research Advances and*

Rabies Control in the Americas, F. Vargas, H. G. Hernández, T. Legaspi, and A. Lecuona (eds.). Mexico, D. F., pp. 14–15.

- Drugmand, J. C., Schneider, Y. J., & Agathos, S. N. (2012). Insect cells as factories for biomanufacturing. *Biotechnology advances*, 30(5), 1140-1157.
- Facciabene, A., Aurisicchio, L., & La Monica, N. (2004). Baculovirus vectors elicit antigen-specific immune responses in mice. *Journal of virology*, 78(16), 8663-8672.
- Federici, B. A. (1985). Viral pathogens of mosquito larvae. *Bull. Amer. Mosquito Control Assoc*, 6, 62-74.
- Fekadu, M., Shaddock, J. H., Ekström, J., Osterhaus, A. D. M. E., Sanderlin, D. W., Sundquist, B., & Morein, B. (1992). An immune stimulating complex (ISCOM) subunit rabies vaccine protects dogs and mice against street rabies challenge. *Vaccine*, 10(3), 192-197.
- Feng, Q., Liu, Y., Qu, X., Deng, H., Ding, M., Lau, T. L., ... & Chen, J. (2006). Baculovirus surface display of SARS coronavirus (SARS-CoV) spike protein and immunogenicity of the displayed protein in mice models. *DNA and cell biology*, 25(12), 668-673.

- Fournier, P., Motagnon, B., Vincent-Falquet, J.C., Ajjan, N., Drucker, J. and Roumiantzeff, M.A. New vaccine produced from rabies cultivated on vero cells. In: Improvements in Postexposure Rabies Treatment (Eds Vodpija, I., Nicholson, K.A., Smerdel, S. and Bijok, U.) Zagreb Institute of Health, Zagreb, 1985, pp. 115-121
- Fu, Z. F., Dietzschold, B., Schumacher, C. L., Wunner, W. H., Ertl, H. C., & Koprowski, H. (1991). Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 88(5), 2001-2005.
- Fujii, H., Takita-Sonoda, Y., Mifune, K., Hirai, K., Nishizono, A., & Mannen, K. (1994). Protective efficacy in mice of post-exposure vaccination with vaccinia virus recombinant expressing either rabies virus glycoprotein or nucleoprotein. *The Journal of general virology*, 75, 1339-1344.
- Galazka AM, Tetanus. In: Module 3: The Immunological Basis for Immunization Series. World Health Organization Expanded Programme on Immunization, WHO/EPI/GEN/93.13. WHO, Geneva, 1993, pp. 1±22.
- George, S., S. Sokolenko and M.G. Aucoin. (2012). Rapid and cost-effective baculovirus sample preparation method as a viable alternative to conventional preparation for quantitative real-time PCR. *J. Virol. Methods*, 182: 27-36.

- Gerloni, M., Xiong, S., Mukerjee, S., Schoenberger, S. P., Croft, M., & Zanetti, M. (2000). Functional cooperation between T helper cell determinants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13269-13274.
- Glenney AT, Pope CG, Waddington H, Wallace U. XXIII—the antigenic value of toxoid precipitated by potassium alum. *J Pathol Bacteriol* 1926;29:38–9.
- Good, M. F., Maloy, W. L., Lunde, M. N., Margalit, H., Cornette, J. L., Smith, G. L., ... & Berzofsky, J. A. (1987). Construction of synthetic immunogen: use of new T-helper epitope on malaria circumsporozoite protein. *Science*, 235(4792), 1059-1062.
- Harrison, R. L., & Jarvis, D. L. (2006). Protein N-Glycosylation in the Baculovirus–Insect Cell Expression System and Engineering of Insect Cells to Produce “Mammalianized” Recombinant Glycoproteins. *Advances in virus research*, 68, 159-191.
- Hitchman, R. B., Siaterli, E. A., Nixon, C. P., & King, L. A. (2007). Quantitative real-time PCR for rapid and accurate titration of recombinant baculovirus particles. *Biotechnology and bioengineering*, 96(4), 810-814.

- Hoskins, J.M. Laboratory Techniques in Rabies: Duck-embryo vaccine. 3rd ed. (Eds Kaplan, M.M. and Koprowski, H. ), World Health Organization, Geneva, 1973, pp. 243-255
- Huang, H., Xiao, S., Qin, J., Jiang, Y., Yang, S., Li, T., ... & Xia, X. (2011). Construction and immunogenicity of a recombinant pseudotype baculovirus expressing the glycoprotein of rabies virus in mice. Archives of virology, 156(5), 753-758.
- Kim, S., & Chang, J. (2012). Baculovirus-based vaccine displaying respiratory syncytial virus glycoprotein induces protective immunity against RSV infection without vaccine-enhanced disease. Immune network, 12(1), 8-17.
- Kost, T. A., & Condreay, J. P. (1999). Recombinant baculoviruses as expression vectors for insect and mammalian cells. Current opinion in biotechnology, 10(5), 428-433.
- Kost, T. A., Condreay, J. P., & Jarvis, D. L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. Nature biotechnology, 23(5), 567-575.
- Krebs, J. W., Smith, J. S., Rupprecht, C. E., & Childs, J. E. (1997). Rabies surveillance in the United States during 1996. Journal of the American Veterinary Medical Association, 211(12), 1525-1539.



- Lucas, C. H., Pino, F. V., Baer, G., Morales, P. K., Cedillo, V. G., Blanco, M. A., & Avila, M. H. (2007). Rabies control in Mexico. *Developments in biologicals*, 131, 167-175.
- Luckow, V. A., & Summers, M. D. (1988). Signals important for high-level expression of foreign genes in *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus expression vectors. *Virology*, 167(1), 56-71.
- Luckow, V. A., Lee, S. C., Barry, G. F., & Olins, P. O. (1993). Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. *Journal of Virology*, 67(8), 4566-4579.
- Meslin, F. X., Kaplan, M. M., & Koprowski, H. (Eds.). (1996). *Laboratory techniques in rabies* (pp. 157-174). Geneva: World Health Organization.
- Migliorini, P., Boulanger, N., Betschart, B., & Corradin, G. (1990). *Plasmodium berghei* Subunit Vaccine: Repeat Synthetic Peptide of Circumsporozoite Protein Comprising T-and B-Cell Epitopes Fails to Confer Immunity. *Scandinavian journal of immunology*, 31(2), 237-242.
- Morimoto, K., Foley, H. D., McGettigan, J. P., Schnell, M. J., & Dietzschold, B. (2000). Reinvestigation of the role of the rabies virus glycoprotein in viral pathogenesis using a reverse genetics approach. *Journal of neurovirology*, 6(5), 373-381.

- Morimoto, K., McGettigan, J. P., Foley, H. D., Hooper, D. C., Dietzschold, B., & Schnell, M. J. (2001). Genetic engineering of live rabies vaccines. *Vaccine*, 19(25), 3543-3551.
- Murphy, C. I., Piwnica-Worms, H., Grünwald, S., Romanow, W. G., Francis, N., & Fan, H. Y. (2004). Overview of the baculovirus expression system. *Current Protocols in Molecular Biology*, 16-9.
- Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G., & Lanzavecchia, A. (1989). Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *European journal of immunology*, 19(12), 2237-2242.
- Panina-Bordignon, P., Tan, A., Termijtelen, A., Demotz, S., Corradin, G., & Lanzavecchia, A. (1989). Universally immunogenic T cell epitopes: promiscuous binding to human MHC class II and promiscuous recognition by T cells. *European journal of immunology*, 19(12), 2237-2242.
- Pearson, M. N., Groten, C., & Rohrmann, G. F. (2000). Identification of the *Lymantria dispar* Nucleopolyhedrovirus Envelope Fusion Protein Provides Evidence for a Phylogenetic Division of the Baculoviridae. *Journal of virology*, 74(13), 6126-6131.

- Peralta, A., Molinari, P., Conte-Grand, D., Calamante, G., & Taboga, O. (2007). A chimeric baculovirus displaying bovine herpesvirus-1 (BHV-1) glycoprotein D on its surface and their immunological properties. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(2), 407-414.
- Perrin, P., Jacob, Y., Aguilar-Setien, A., Loza-Rubio, E., Jallet, C., Desmezieres, E., & Tordo, N. (1999). Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine*, 18(5), 479-486.
- Rogan, D., & Babiuk, L. A. (2005). Novel vaccines from biotechnology. *Revue Scientifique et Technique-Office International des Épizooties*, 24(1), 159.
- Rohrmann, G. F. 1999. Nuclear polyhedrosis viruses, p. 127-139. In R. G. Webster and A. Granoff (ed.), *Encyclopedia of virology*, 2nd ed. Academic Press, London, United Kingdom.
- Seligmann Jr., E.B., 1973. Laboratory Techniques in Rabies: The NIH Test for Potency. 3rd ed. (Eds Kaplan, M.M. and Koprowski, H.), World Health Organization, Geneva, 1973, pp. 279–286.
- Seligmann Jr., E.B., 1973. Laboratory Techniques in Rabies: The NIH Test for Potency. *Monogr Ser World Health Organ*, pp. 279–286.
- Seligmann Jr., E.B., 1973. Laboratory Techniques in Rabies: The NIH Test for Potency. *Monogr Ser World Health Organ*, , pp. 279–286.

- Seligmann, S. Jr. Laboratory Techniques in Rabies: Semple-type vaccine. 3rd ed. (Eds Kaplan, M.M. and Koprowski, H.), World Health Organization, Geneva, 1973, pp. 193-198
- Smith, G. E., Fraser, M. J., & Summers, M. D. (1983). Molecular engineering of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *Journal of Virology*, 46(2), 584-593.
- Strauss, R., Hüser, A., Ni, S., Tuve, S., Kiviat, N., Sow, P. S., ... & Lieber, A. (2007). Baculovirus-based vaccination vectors allow for efficient induction of immune responses against *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein. *Molecular Therapy*, 15(1), 193-202.
- Summers, M. D. (2006). Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector systems and viral pesticides. *Advances in virus research*, 68, 3-73.
- Summers, Max D. "Milestones leading to the genetic engineering of baculoviruses as expression vector systems and viral pesticides." *Advances in virus research* 68 (2006): 3-73.
- Tesoro-Cruz, E., Calderón-Rodríguez, R., Hernández-González, R., Blanco-Favéla, F., & Aguilar-Setién, A. (2008). Intradermal DNA vaccination in ear pinnae is an efficient route to protect cats against rabies virus. *Veterinary research*, 39(2), 1-11.

- Tordo, N., Poch, O., Ermine, A., Keith, G., & Rougeon, F. (1986). Walking along the rabies genome: is the large GL intergenic region a remnant gene? *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(11), 3914-3918.
- Turki, I., Hammami, A., Kharmachi, H., & Mousli, M. (2014). Engineering of a recombinant trivalent single-chain variable fragment antibody directed against rabies virus glycoprotein G with improved neutralizing potency. *Molecular immunology*, 57(2), 66-73.
- Uhaa, I. J., Mandel, E. J., Whiteway, R., & Fishbein, D. B. (1992). Rabies surveillance in the United States during 1990. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 200(7), 920-929.
- Valmori D., Pessi P., Bianchi E., and Corradin G. (1992). Use of human universally antigenic tetanus toxin t cell epitopes as carriers for human vaccination. *The Journal of Immunology*, 149 (2), 717-721.
- Wiktor, T. J., György, E., Schlumberger, H. D., Sokol, F., & Koprowski, H. (1973). Antigenic properties of rabies virus components. *The Journal of Immunology*, 110(1), 269-276.
- Winstanley, D., and D. O'Reilly. 1999. *Granuloviruses*, 2nd ed. Academic Press, London, United Kingdom.

- World Health Organization. 2005. WHO Expert Committee on Rabies, 2004. First report, WHO technical report series 931. World Health Organization, Geneva, Switzerland.
- Wu, Q., Yu, F., Xu, J., Li, Y., Chen, H., Xiao, S., ... & Fang, L. (2014). Rabies-virus-glycoprotein-pseudotyped recombinant baculovirus vaccine confers complete protection against lethal rabies virus challenge in a mouse model. *Veterinary microbiology*, 171(1), 93-101.
- Wu, Q., Yu, F., Xu, J., Li, Y., Chen, H., Xiao, S., ... & Fang, L. (2014). Rabies-virus-glycoprotein-pseudotyped recombinant baculovirus vaccine confers complete protection against lethal rabies virus challenge in a mouse model. *Veterinary microbiology*, 171(1), 93-101.
- Wunner WH. 2007. Rabies virus, p23– 68. In Jackson AC, Wunner WH (ed), *Rabies*. Elsevier/Academic Press, London, United Kingdom.
- Wunner, W. H., Dietzschold, B., Curtis, P. J., & Wiktor, T. J. (1983). Rabies subunit vaccines. *Journal of General Virology*, 64(8), 1649-1656.
- Yin, X., Li, Z., Li, J., Yi, Y., Zhang, Y., Li, X., & Liu, J. (2013). Rabies virus nucleoprotein expressed in silkworm pupae at high-levels and evaluation of immune responses in mice. *Journal of biotechnology*, 163(3), 333-338.

## **VIII. Anexos**

### **Anexo 1. Protocolo de inmunización segundo experimento de desafío.**

Se desarrollaron inmunógenos recombinantes del antígeno gG del virus de la rabia. Se realizaron 6 preparaciones: gG; gGP2, gGP30, gGp2-gGP30, gGP2M, gGP30M y gGP2M-gGP30M. Los cuales consisten en el antígeno gG nativo del virus de la rabia, dos variantes que tienen fusionados al antígeno gG los epítomos inmunoestimulantes P2 y P30, en combinación con la proteína M del virus de influenza. Estos antígenos se han producidos en un sistema de baculovirus.

Se desea evaluar los niveles de protección conferidos por estos antígenos recombinantes contra un desafío letal del virus de la rabia. Para esto se inmunizaron ratones BALB/C de 11 a 13g, hembras, con 500 µl de estos baculovirus.

Se tendrán 9 grupos de 7 ratones cada uno para evaluar cada inmunógeno y los controles. Se evaluarán una dosis de  $5 \times 10^8$  copias virales de los baculovirus recombinantes. En este experimento se evaluarán la vía intra-peritoneal para la inmunización. El control positivo fue inmunizado intraperitonealmente con una vacuna inactivada comercial (Defensor ®1 de Pfizer S.A. de C.V.) diluida diluida una dosis para cinco ratones, y el control negativo con PBS.

Esquema de inmunización.

Se realizarán dos inmunizaciones, con un refuerzo a los 7 días post inmunización y se realizará el desafío a los 14 días post inmunización con una inyección intracerebral de 25 DLRA50%/30ul del virus de la rabia cepa CVS. El experimento se continuara por 20 días para observar sobrevivientes. Duración total del experimento 34 días.

En el Cuadro 21 se muestran el esquema de inmunización para cada antígeno.

<b>GRUPO</b>	<b>Construcción</b>	<b>Ratones</b>
<b>1</b>	control (+) Vacuna 1/5	7
<b>2</b>	Control (-) PBS	7
<b>3</b>	gGHist 5 X10 <sup>8</sup> copias	7
<b>4</b>	gGP2 5 X10 <sup>8</sup> copias	7
<b>5</b>	gG P30 5 X10 <sup>8</sup> copias	7
<b>6</b>	gGP2 + P30 5 X10 <sup>8</sup> copias	7
<b>7</b>	gGp2 M 5 X10 <sup>8</sup> copias	7
<b>8</b>	gGP30 M 5 X10 <sup>8</sup> copias	7
<b>9</b>	gGP2M + P30M 5 X10 <sup>8</sup> copias	7
<b>Total</b>		<b>60</b>

**Cuadro 21. Esquema de inmunización 2° experimento de desafío.** Ratones inmunizados con: gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, gGP2: glicoproteína G con el epítipo P2, gGP30: glicoproteína G con el epítipo P30, gGP2+gGP30: glicoproteína G con epítipo P2 y glicoproteína G con epítipo P30, gGP2M: glicoproteína G con el epítipo P2 y la proteína M de influenza, gGP30M: glicoproteína G con el epítipo y la proteína M de influenza, control, gGP2M+gGP30M: glicoproteína G con el epítipo P2 y la proteína M de influenza más la glicoproteína G con el epítipo y la proteína M de influenza, control (+): Vacuna comercial diluida 1/5, control (-): PBS estéril.



## **Anexo 2. Protocolo de inmunización tercer experimento de desafío.**

Se han desarrollado inmunógenos recombinantes del antígeno gG del virus de la rabia expresados en baculovirus. Se tiene 3 antígenos: gGHist, y gGP2 y gGP30. Los cuales consisten en el antígeno gG nativo del virus de la rabia con una cola de 6 histidinas, y dos variantes antigénicas que tienen fusionados al antígeno gG los epítomos inmunoestimulantes P2 y P30 en el extremo amino terminal.

Estos antígenos se probarán en dos concentraciones junto a dos adyuvantes: el hidróxido de Aluminio e interferon  $\alpha$ . Los antígenos se produjeron en un sistema de baculovirus.

En este experimento se desea evaluar los niveles de protección conferidos por estos antígenos recombinantes contra un desafío del virus de la rabia.

Para esto se inmunizaron ratones BALB/C de 11 a 13g, hembras, con 500ul, ya incluyendo el adyuvante.

Considerando los diferentes inmunógenos y los controles se hicieron 14 grupos de 5 ratones en cada uno para cada inmunógeno y los controles. Se evaluarán dos dosis de  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^9$  copias virales de los baculovirus recombinantes. En este experimento se empleó la vía intraperitoneal.

El control positivo se inmunizará intraperitonealmente con una vacuna inactivada comercial (Defensor ®1 de Pfizer S.A. de C.V.) diluida una dosis para cinco ratones (1/5), y el control negativo con PBS.

Se realizarán dos inmunizaciones, con un refuerzo a los 7 días post inmunización y se realizará el desafío a los 14 días post inmunización con una inyección intracerebral 25 DLRA50%/30ul del virus de la rabia cepa CVS. El experimento se continuará por 12 días para observar a los sobrevivientes. Duración total del experimento 28 días. En el Cuadro 8.2 se muestran el esquema de inmunización para cada antígeno.

<b>GRUPO</b>	<b>Construcción</b>	<b>Ratones</b>
<b>1</b>	Control (-) PBS	5
<b>2</b>	Control (+) Vacuna 1/5	5
<b>3</b>	gGP2-gGP30	5
<b>4</b>	[gGP-gG2P30]	5
<b>5</b>	gGP2P30 + Al(OH) <sub>3</sub>	5
<b>6</b>	[gGP-gG2P30] + Al(OH) <sub>3</sub>	5
<b>7</b>	gGHist	5
<b>8</b>	[gGHist]	5
<b>9</b>	gGHist + Al(OH) <sub>3</sub>	5
<b>10</b>	[gGHist] + Al(OH) <sub>3</sub>	5
<b>11</b>	gGP2-gGP30 + Inf $\alpha$	5
<b>12</b>	[gGP2P30] + Inf $\alpha$	5
<b>13</b>	gGHist+ Inf $\alpha$	5
<b>14</b>	[gGHist] + Inf $\alpha$	5
<b>Total</b>		<b>70</b>

**Cuadro 22 Esquema de inmunización 3<sup>er</sup> experimento de desafío.** Ratones inmunizados con: gGHist: glicoproteína G con cola de Histidinas, [gGHist]: glicoproteína G con cola de Histidinas concentrado, gGP2 - gGP30: glicoproteína G con epítipo P2 y glicoproteína G con epítipo P30, [gGP2 - gGP30]: glicoproteína G con epítipo P2 y glicoproteína G con epítipo P30 concentrado, control (+): Vacuna comercial diluida 1/5, control (-): PBS estéril. Adyuvantes: Al(OH)<sub>3</sub>: Hidróxido de aluminio; Inf  $\alpha$ : interferon  $\alpha$ .

Adyuvantes que se emplearan

Adyuvante 1.- Hidróxido de aluminio 1:1. Rehydragel LV. General Chemical LLC

90 East Halsey Road. Parsippany, NJ 07054.

Adyuvante 2.- Alfa interferón. 25 ug/dosis. Producido por Miguel Angel Gómez

Lim. Proporcionado por Beatriz Flores. Solución al 2.2 mg/ml.