



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

**CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA VACUNA QUE EMPLEA LOS EPÍTOPOS
LINEALES DE LA GLICOPROTEÍNA DEL VIRUS DE LA RABIA USANDO COMO
ADYUVANTE A LA PROTEÍNA C3D**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. GUILLERMO GALVEZ ROMERO

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JOSÉ ÁLVARO AGUILAR SETIÉN
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DRA. MARÍA EUGENIA TORRES MARQUEZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., ENERO, 2020



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

OFICIO CPCB/1273/2019

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **02 de septiembre de 2019** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **GALVEZ ROMERO GUILLERMO** con número de cuenta **506012062** con la tesis titulada **"CONSTRUCCIÓN Y EVALUACIÓN DE UNA VACUNA QUE EMPLEA LOS EPÍTOPOS LINEALES DE LA GLICOPROTEÍNA DEL VIRUS DE LA RABIA USANDO COMO ADYUVANTE A LA PROTEÍNA C3d"**, realizada bajo la dirección del **DR. JOSÉ ÁLVARO AGUILAR SETIÉN**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. CARLOS FEDERICO ARIAS ORTIZ
Vocal: DR. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES
Secretario: DR. ENRIQUE ORTEGA SOTO
Suplente: DRA. LILIÁN YÉPEZ MULIA
Suplente: DR. ALBERTO MONROY GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 25 de noviembre de 2019

COORDINADOR DEL PROGRAMA


DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



c. c. p. Expediente del alumno(a)

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por la formación académica recibida.

A CONACYT, por la beca 172491/172491, recibida durante el programa de doctorado y al IMSS que financió el proyecto mediante el apoyo FIS/IMSS/PROT/MD13/1266 y al Programa de Formación de Investigadores-IMSS 99092365 por el apoyo complementario.

Finalmente, a mi Tutor Principal Dr. Álvaro Aguilar Setién y a los miembros del Comité Tutor, Dr. Enrique Ortega Soto y Dra. María Eugenia Torres Marquez por sus invaluable aportaciones al proyecto y guía durante el desarrollo del mismo.

AGRADECIMIENTOS A TITULO PERSONAL

Agradezco a mis padres, Arminda y Guillermo por TODO, que junto con mis hermanos Ale y Hugo, son el fundamento de mi vida y ejemplo de la tenacidad y unidad. Los amo

A mi amada esposa Mónica que siempre estuvo apoyándome y dando aliento cuando todo se veía mal.

A mis amigos del alma Gina y Raúl que siempre han estado al pendiente de mí y me han brindado su apoyo incondicional.

A la Dra. Mónica Salas por el apoyo técnico y logístico en el manejo de los ratones e intelectual en la elaboración del proyecto y artículo científico.

A la Dra. Ericka Pompa por su valiosa asesoría en ingeniería genética e importante aporte en la escritura del artículo científico.

Al personal de la UIMII del CM La Raza y UIMI del CM Siglo XXI del IMSS, en particular a mis compañeros del labo de virología Lety, Hayde, Flor, Cirani, Martha, Leo, que siempre me tendieron la mano.

DEDICATORIA

A Mariana, que es la luz de mi vida.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS

<u>I. RESÚMEN</u>	1
<u>I. ABSTRACT</u>	3
<u>II. INTRODUCCIÓN</u>	5
<u>III. HIPÓTESIS</u>	14
<u>IV. OBJETIVOS</u>	14
GENERAL	14
PARTICULARES	14
<u>V. MATERIALES Y MÉTODOS</u>	15
MATERIAL BIOLÓGICO Y PLÁSMIDO.	15
<u>CEPAS BACTERIANAS.</u>	15
<u>CEPAS VIRALES.</u>	15
<u>LÍNEAS CELULARES.</u>	15
<u>PLÁSMIDO. PVAX1,</u>	15
INGENIERÍA GENÉTICA.	16
<u>SÍNTESIS DE SECUENCIA G5.</u>	16
<u>GENERACIÓN DEL PLÁSMIDO VACUNAL PVAXG5.</u>	17
<u>SÍNTESIS DE SECUENCIA P28.</u>	19
<u>GENERACIÓN DEL PLÁSMIDO VACUNAL PVAXF1.</u>	20
PRODUCCIÓN DE LAS VACUNAS.	22
TRANSFECCIÓN.	22
DETECCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.	23
INMUNIZACIÓN Y RETO.	24
ENSAYO DE SERONEUTRALIZACIÓN DEL VIRUS DE LA RABIA (RRFF).	25
EVALUACIÓN DE SIGNOS CLÍNICOS.	26
ENSAYO DE PROLIFERACIÓN	26
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.	27
<u>VI. RESULTADOS</u>	28
SÍNTESIS DE LA SECUENCIA DEL EPÍTOPO LINEAL G5 DEL VIRUS DE LA RABIA	28
SÍNTESIS DE LA SECUENCIA DEL ADYUVANTE MOLECULAR C3D-P28 MURINO.	30

PRODUCCIÓN DE VACUNAS	33
EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.	33
INMUNIZACIÓN Y RETO.	34
ENSAYO DE SERONEUTRALIZACIÓN.	35
RETO	37
EVALUACIÓN DE SIGNOS CLÍNICOS.	38
PROLIFERACIÓN.	39
<u>VII. DISCUSIÓN</u>	<u>41</u>
<u>VIII. CONCLUSIÓN</u>	<u>45</u>
<u>IX. LITERATURA CITADA</u>	<u>46</u>
<u>X. APENDICE</u>	<u>54</u>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.- Mapa del plásmido pVAX1®.	16
Figura 2. Producción del plásmido vacunal pVaxG5..	19
Figura 3. Producción del plásmido vacunal pVaxF1.....	21
Figura 4. Electroforesis de G5	28
Figura 5. Electroforesis de G5 y pVAX1 puros y listos para la ligación.	29
Figura 6. Electroforesis de clonas transformadas con G5-pVAX1.	29
Figura 7. Electroforesis de PCR de clonas transformadas con G5-pVAX1.	30
Figura 8. Electroforesis de P28 y G5 y P28 listos para ligarse.	31
Figura 9. Electroforesis de G5 y P28 ligados (F1). F1 y pVAX1 listos para ligarse	31
Figura 10. Electroforesis de clonas transformadas con F1-pVAX1. Y PCR de clona +	32
Figura 11. Electroforesis de los plásmidos vacúnales pGQH, pVaxG5 y pVaxF1	33
Figura 12. Dot Blot de proteínas totales. pVaxF1, . pVaxG5 y pGQH.....	34
Figura 13. Esquema de inmunización y reto.	35
Figura 14. Título de anticuerpos neutralizantes.....	36
Figura 15.- Gráfica de la sobrevida de los animales.....	37
Figura 16. Puntaje de signos clínicos de rabia.....	39
Figura 17. Proliferación de células B y Células T	40

I. RESÚMEN

La rabia es una enfermedad fatal que afecta el sistema nervioso de mamíferos. Sus principales reservorios y vectores son carnívoros y quirópteros. Anualmente, se estiman 60,000 casos de rabia en humanos transmitida por perros, afectando principalmente a países en desarrollo. En México, los casos de rabia canina han sido controlados mediante vacunación. Sin embargo, el murciélago hematófago aún produce gran número de casos en ganado y algunos casos reportados en humanos. Esta enfermedad es causada por el virus de la rabia (RABV). Su patogenicidad depende de la glicoproteína (G) que además es el principal blanco inmunológico e induce la producción de anticuerpos neutralizantes del virus (VNAs). El virus atenuado o inactivado ha sido el principal inmunógeno empleado para la producción de vacunas; sin embargo, se han estudiado aproximaciones para el desarrollo de vacunas contra la rabia más baratas y seguras. La mayoría de los VNAs reconocen epítopos conformacionales; no obstante, algunos estudios han mostrado que el péptido lineal G5 es capaz de inducir VNAs. Por otro lado, el péptido C3d-P28 que es un fragmento del componente 3 del complemento (C3), está involucrado en la opsonización de antígenos y activación de células B y es considerado un adyuvante molecular que mejora la respuesta de anticuerpos en vacunas virales. Las vacunas de ADN son una opción segura y económica. Si bien las que se han reportado contra la rabia estimulan una respuesta inmune protectora, generalmente es necesaria la aplicación de múltiples dosis e implican un mayor gasto energético en cuanto a producción del antígeno recombinante y su posterior procesamiento. En el presente trabajo se evaluó el péptido lineal G5 como un modelo de vacuna de ADN con y sin la secuencia que codifica para C3d-P28, a fin de obtener una vacuna simple y eficaz contra el RABV. Se probaron en modelo murino, dos vacunas de

ADN: una basada en el epítipo lineal G5 (vacuna pVaxG5) y otra que consistió en la fusión de G5 con el adyuvante molecular C3d-P28 (vacuna pVaxF1). Se usó como control la vacuna pGQH que expresa la G completa. Se midieron los títulos de VNAs, la sobrevida y la proliferación antígeno específica de las células B y T. Aunque el grupo inmunizado con pVaxG5 mostró altos niveles ($5.3 \text{ UI/mL} \pm 1.4$) de VNAs 15 días post inmunización, estos decrecieron gradualmente (al día 90, $1.6 \text{ UI/mL} \pm 2.2$). Por otro lado, los VNAs del grupo inmunizado con la vacuna pVaxF1 se mantuvieron a niveles constantes ($3.7 \text{ UI/mL} \pm 2.2$). Al comparar el nivel de VNAs inducidos por las vacunas pVaxG5 y pVaxF1 con los de la vacuna pGQH, no se encontraron diferencias significativas. La tasa de sobrevida al reto ($22 \text{ DL}_{50\%}$ virus CVS) de los ratones inmunizados con pVaxG5 fué del 27%, incrementándose al 50% con los inmunizados con pVaxF1. Las vacunas pGQH y pVaxF1 incrementaron la proliferación antígeno específica de células T $\text{CD4}^+ \text{CD8}^+$ y solo la pVaxF1 incremento significativamente la proliferación de células B. Los resultados sugieren que el epítipo lineal G5 induce VNA contra RABV y es un candidato potencial para desarrollar una vacuna genética. La adición del adyuvante C3d-P28 contribuye a la sobrevida al mantener un nivel protector de VNA durante 90 días.

I. ABSTRACT

Rabies is a fatal disease that affects the nervous system of mammals. Its main reservoirs and vectors are carnivores and chiroptera. Annually, 60,000 cases of rabies in humans transmitted by dogs are estimated, affecting mainly developing countries. In Mexico, cases of canine rabies have been controlled by vaccination. However, the hematophagous bat still produces a large number of cases in cattle and some in humans.

This disease is caused by the rabies virus (RABV). Its pathogenicity depends on the glycoprotein (G) which is also the main target and inducer of virus neutralizing antibodies (VNA). The complete attenuated or inactivated virus has been the main means for the production of vaccines; however, approaches for the development of cheaper and safer rabies vaccines are being studied. Most VNAs recognize conformational epitopes; nevertheless, some studies have shown that a linear peptide (G5) is capable of inducing VNAs. On the other hand, the C3d-P28 protein, which is part of the complement and is involved in the opsonization of antigens and activation of B cells, is considered a molecular adjuvant that improves the antibody response in viral vaccines. DNA vaccines are a safe and economical option. Although those that have been reported against rabies stimulate a protective immune response, it is generally necessary to apply multiple doses and involve a significant energy expenditure in terms of production of the recombinant antigen and its subsequent processing. In the present work, a DNA vaccine expressing the G5 linear peptide linked to the sequence coding for C3d-P28 was evaluated in order to obtain a simple and effective vaccine. Two DNA vaccines based on the linear epitope G5 (pVaxG5 vaccine) and another consisting of the fusion of G5 with the molecular adjuvant C3d-P28 (pVaxF1 vaccine) were tested in a murine model. The pGQH vaccine expressing the complete G protein was used as control. Titers of VNAs, survival and antigen-specific

proliferation of B and T cells were measured. Although the group immunized with pVaxG5 showed high levels ($5.3 \text{ IU/mL} \pm 1.4$) of VNAs 15 days post immunization, these gradually decreased (at day 90, $1.6 \text{ IU/mL} \pm 2.2$), while the VNAs of the group immunized with the pVaxF1 vaccine remained constant ($3.7 \text{ IU/mL} \pm 2.2$). When comparing the VNAs levels induced by pVaxG5 and pVaxF1 vaccines with those of the pGQH vaccine, no significant differences were found. The challenge survival rate (22 LD_{50%} CVS viruses) of the mice immunized with pVaxG5 was 27%, increasing to 50% in those immunized with pVaxF1. The pGQH and pVaxF1 vaccines increased the specific antigen proliferation of CD4⁺, CD8⁺ T cells; only pVaxF1 significantly increased B cell proliferation. Altogether, the results suggest that the G5 linear epitope induces VNA against RABV and is a candidate to develop a genetic vaccine, and the addition of adjuvant C3d-P28 contributes to survival by maintaining protecting levels of VNA for 90 days.

II. INTRODUCCIÓN

2.1 LA RABIA

La rabia es una enfermedad zoonótica, aguda, progresiva y fatal. El agente etiológico es el virus de la rabia (RABV), el cual está adaptado para replicarse en el sistema nervioso (SN) de mamíferos, de los cuales los carnívoros (perros, gatos, lobos, zorros, coyotes, mapaches, zorrillos) y quirópteros son los principales reservorios y vectores (1, 2, 3). En particular se ha sugerido, mediante análisis de reconstrucción filogenética, que los murciélagos son los hospederos ancestrales de este virus (4).

RABV pertenece al orden Mononegavirales, familia Rhabdoviridae, Género Lyssavirus. Tiene un genoma ARN no segmentado, de hebra simple, polaridad negativa, con un tamaño de 12 kb, el cual contiene 5 genes que codifican para la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), la proteína de matriz (M), la glicoproteína (G) y una ARN polimerasa (L) dependiente de ARN viral (5). El genoma está envuelto en un complejo formado por las proteínas N, P y L denominada ribonucleoproteína (RNP), la cual es necesaria para la síntesis y replicación del material genético. La proteína M, envuelve a la RNP y la une de forma estrecha a la membrana viral compactando al virión (6, 7, 8). Los viriones están envueltos por espículas (trímeros) de glicoproteína, la cual desempeña un papel fundamental en la patogénesis (9, 10, 11, 12), reconociendo receptores celulares, mediando la fusión de la proteína M con la membrana celular, así como ensamblando y liberando partículas virales infecciosas (7). Además, al ser la proteína externa del virus, induce la formación de anticuerpos neutralizantes del virus (VNAs) y la respuesta de células T lo que deriva en generar inmunidad contra la infección por el mismo (5, 12).

En general, RABV es transmitido por la saliva a través de la mordedura o el rasguño de un animal infectado (13, 14, 15). El inicio del ciclo viral se da mediante la unión de su glicoproteína con el receptor celular. El posterior ingreso a la célula se da mediante el endosoma, en donde ocurre un cambio conformacional de la glicoproteína que permite la fusión de la envoltura viral con la membrana endosómica. Finalmente, la RNP es liberada al citoplasma para iniciar la transcripción y replicación viral (16, 8, 7).

La rabia es considerada una enfermedad zoonótica descuidada y está presente en gran parte del mundo principalmente en países de Asia, África y América (17). La mayoría de los casos en humanos (99%) sucede por mordedura de perro, estimándose 60,000 casos anualmente (18).

En México la reducción de los casos de rabia en humanos transmitida por perros se debe principalmente a las intensas campañas de vacunación en animales de compañía (8.7 millones de dosis en el 2017) (19). Sin embargo, otros potenciales vectores de la enfermedad como perros callejeros y fauna silvestre deben ser considerados en estos esquemas de prevención.

El principal vector entre la fauna silvestre es el murciélago hematófago (*Desmodus rotundus*) (20). Uno de los factores que determina la distribución de estos quirópteros es la presencia del ganado bovino, del cual se alimentan con facilidad y así pueden transmitir el virus rábico a través de la saliva. Si el ganado no está protegido (mediante la vacunación), puede padecer la enfermedad y ocasionarle la muerte, lo que repercute en graves pérdidas económicas (21).

En el país se han notificado focos de rabia parálitica bovina en 25 estados de la República desde el sur de Sonora por toda la costa del Pacífico hasta Chiapas y desde el sur de Tamaulipas hasta la Península de Yucatán por el Golfo de México. El resto del país es libre,

pues no reúne las condiciones ecológicas para la sobrevivencia del murciélago *D. rotundus* (22).

La rabia se puede prevenir totalmente con la vacunación. La Organización Mundial de la Salud (OMS) recomienda un esquema de pre-exposición a humanos y animales domésticos que están en riesgo. Para humanos que fueron atacados por animales rabiosos se aplica una profilaxis post-exposición (13).

2.2 VACUNAS ANTIRRÁBICAS

La historia de las vacunas en contra de la rabia se puede dividir en 4 generaciones. Las vacunas de primera generación son aquellas producidas a partir del tejido nervioso de animales infectados, así se desarrolló la primera vacuna de los trabajos de Pasteur y Roux en 1887, empleando tejido nervioso de conejos infectados con virus que era inactivado por desecación. Posteriormente se produjeron vacunas con tejido nervioso de ovejas y cabras (vacunas tipo Fermi) que eran inactivadas con fenol. En 1911, se desarrollaron las vacunas tipo Semple con tejido nervioso de conejos, estas vacunas también fueron inactivadas con fenol y aunque se redujo el riesgo de algún accidente post-vacunación por virus insuficientemente inactivado, podían provocar severos daños neurológicos debido a la reacción del sistema inmune a la mielina de dichos tejidos presente en esas vacunas. Después se produjeron vacunas en cerebros de ratones lactantes que aún no desarrollaban totalmente la mielina (vacunas tipo Fuenzalida-Palacios), lo cual redujo las reacciones secundarias y además estaban inactivadas con β -propiolactona (23).

La segunda generación de vacunas, fueron desarrolladas a partir de cultivos celulares (VERO, células diploides de humano o mono, entre otras líneas) a partir de distintas

variedades de virus (ERA, SAD, Kelev, etc.), en estas se aumentó la pureza del antígeno sin poner en riesgo la inmunogenicidad. Además, con esto se evitaron las reacciones de hipersensibilidad por los componentes secundarios de las vacunas basadas en tejidos animales. Sin embargo, el proceso de producción de estas vacunas es más costoso y su manejo es delicado (requieren estricta cadena fría durante el transporte y almacenaje) lo que las hace incosteables para muchos países en desarrollo (24).

Las vacunas de tercera generación son aquellas basadas en proteínas recombinantes o en subunidades de proteínas virales, que hasta el momento solo son de uso veterinario, entre estas se encuentra la vacuna vaccinia-rabia, la cual tiene el gen de la glicoproteína rábica insertado en el virus vaccinia (25). El desarrollo de estas vacunas nació a partir del exitoso control de la rabia transmitida por zorros rojos en Europa durante los años 70s, mediante el uso de cebos que contenían la vacuna atenuada, lograron reducir la rabia en un 80% (26, 27, 28). Siguiendo la estrategia de cebos, EUA y Canadá emplean las vacunas recombinantes VRG (virus vaccinia) y ONRAB (Adenovirus humano) que expresan la glicoproteína de la rabia de manera masiva en campañas de vacunación de fauna silvestre (29). Sin embargo, su producción es onerosa lo que las hace de difícil acceso a muchos países en desarrollo (23).

Cabe mencionar que en la medicina veterinaria se pueden aplicar vacunas de virus inactivado, atenuado o recombinantes en los tratamientos mientras que para la medicina humana sólo está permitido el uso de vacunas de virus inactivado, para evitar el riesgo de cualquier accidente (23).

2.3 VACUNAS DE ADN.

Las vacunas de ADN (de cuarta generación), se basan en la observación de que la inoculación directa de ADN plasmídico resulta en la expresión del antígeno deseado (30). En 1990, se demostró que la inyección de ADN plasmídico puro conduce a la expresión de proteínas no propias en las fibras musculares (31). A partir de entonces se han publicado diversos trabajos sobre la respuesta inmune inducida por la inyección de plásmidos que codifican para antígenos de diversos agentes patógenos (30, 32, 33)

Las vacunas génicas o de ADN presentan varias ventajas sobre las vacunas tradicionales (atenuadas, inactivadas, de subunidades o recombinantes): 1) pueden acarrear genes de proteínas antigénicas o péptidos que aumentan la respuesta inmune; 2) generan respuesta inmune humoral y celular, ya que el antígeno puede ser procesado por la vía endógena y exógena, simulando una infección natural; 3) el proceso de fabricación es más barato, haciéndolas más accesibles para países en desarrollo; 4) el ADN no requiere de una “estricta” cadena fría para ser transportado y almacenado, lo que en países tropicales con orografías altamente accidentadas, como lo es México, hace que la distribución de la vacuna sea más simple, y 5) debido a que, tanto en el proceso de fabricación como de la aplicación, no se maneja el agente infeccioso, estas vacunas pueden ser más seguras, pues se reduce el riesgo de accidentes además de permitir el diseño y experimentación de vacunas contra agentes virales peligrosos (34, 35, 36, 37, 38).

El gen de la glicoproteína del RABV ha sido el principal objeto de estudio para la inmunización a base de ADN (39). Estas vacunas han sido evaluadas en diversos modelos animales. Lodmell y colaboradores evaluaron la efectividad de una vacuna ADN en monos, *Macaca fascicularis*, obteniendo al final del reto una sobrevida del 100%. Además, los sueros neutralizaron un amplio espectro de variantes del virus (40). Posteriormente, en

trabajos realizados por Perrin y colaboradores se inmunizaron con 100 µg de plásmido (pGPV) perros Beagle vía intramuscular produciendo VNAs en contra de dos cepas silvestres además todos los perros vacunados sobrevivieron al reto (41). Tesoro-Cruz y colaboradores desarrollaron una vacuna ADN a partir de un aislado mexicano denominada pGQH, se inmunizaron perros y ratones con dosis de 100 y 50 µg, respectivamente vía intranasal (IN) e intramuscular (IM) con un refuerzo. Detectaron VNAs (arriba de 0.5 UI/mL) en animales inmunizados por vía IN y títulos superiores por vía IM (42). Además, Tesoro-Cruz y colaboradores compararon la vacuna pGQH contra la vacuna tradicional, en una profilaxis post exposición (PPE) vía IN en ratones y conejos, con 4 refuerzos, sin gama globulina (suero hiperinmune antirrábico). Todos los animales que recibieron la vacuna pGQH sobrevivieron al reto y sólo el 80% de los animales vacunados de manera tradicional sobrevivieron (43). En un trabajo posterior, Tesoro-Cruz y colaboradores se detectaron altos niveles de VNAs (>0.5 UI/mL) y la sobrevida del 100% en gatos inmunizados con 100 µg de la vacuna pGQH, vía intradérmica en la punta de la oreja (44). Aguilar-Setién y colaboradores, aplicaron la vacuna pGQH vía IM en dosis de 20 µg, en ratones observando una seroconversión superior a las 0.5 UI/mL y una sobrevida del 100% (45). De este modo, la vacuna pGQH contra el RABV ha demostrado inducir altos niveles de VNAs, y conferir protección en contra de un reto letal con virus.

La cantidad de ADN vacunal administrado en los experimentos previos es alta y el proceso de purificación es costoso. Para evitar el último punto se utilizó una cepa atenuada de *Salmonella* como vector y una citolisina para ayudar a la liberación del plásmido dentro de las células presentadoras de antígeno (46). Se encontró que la aplicación por vía oral de las bacterias con el ADN vacunal y la citolisina induce un nivel protector de VNAs hasta después de los 15 días, además la protección frente al reto fue mayor en los ratones

inmunizados por esta vía en comparación con la inyección intramuscular del plásmido desnudo.

2.4 EPÍTOPO LINEAL G5

Debido a que la inmunogenicidad de la glicoproteína depende de su conformación tridimensional y de las modificaciones post-transduccionales que dan origen a la formación de los sitios antigénicos II (9) y III (47, 48), la mayoría de los trabajos se han enfocado a usar el gen completo de la glicoproteína, sin embargo, algunos péptidos lineales han demostrado ser inmunogénicos. Se identificó un epítipo lineal denominado G5 entre los aminoácidos 244 y 281, ubicado entre los sitios antigénicos II y III, este epítipo no depende de la conformación nativa y confiere protección frente al reto al unirlo con un epítipo de la proteína N (49). Posteriormente se describió un segundo epítipo entre los aminoácidos 249 y 268, la inmunización con este epítipo incrementó los niveles de VNAs contra RABV en conejos (50).

El epítipo G5 sería un buen candidato para la construcción de una vacuna ADN, debido a su simplicidad, a que la secuencia esta conservada en la mayoría de cepas fijas (CVS, SAD, ERA, FLURY y PV) así como en las cepas de calle y es capaz de inducir VNAs y protección frente al reto (51, 49, 52, 53, 54).

2.5 ADYUVANTE MOLECULAR C3d-P28

La inmunización con ADN requiere de altas y múltiples dosis para inducir una respuesta inmune protectora, sin embargo, dicha respuesta puede ser mejorada mediante la inclusión de un adyuvante molecular (55). A este respecto, el uso de adyuvantes moleculares fusionados a algunas vacunas ADN, incrementa el título de anticuerpos y mejora la

respuesta celular antígeno-específica (56). Uno de estos adyuvantes de reciente uso es la proteína C3d del sistema de complemento.

El sistema del complemento está compuesto por más de 20 proteínas solubles y de membrana que son activadas en cascada. Las tres vías que pueden activar el sistema del complemento (clásica, alternativa y de las lectinas) convergen en la formación de C3 convertasa, la cual escinde el tercer componente del complemento C3. El producto final de esta degradación es C3d. Una vez generado, se adhiere simultáneamente a antígenos extraños y a CR2 (CD21) mediante su dominio mínimo conocido como P28 (57). CR2 es parte del complejo receptor de células B junto con CD19 y Tapa-1 (CD81). La unión del CR2 al antígeno facilita su absorción por el receptor de la célula B (BCR). Además, la interacción del BCR y CR2 amplifica la activación de la célula B (58). El complejo C3d-CR2 une la respuesta inmune innata con la respuesta inmune adaptativa, es decir C3d es un adyuvante natural que amplifica la señal requerida para la activación de la célula B y por lo tanto incrementa el procesamiento del antígeno, la presentación y la producción de anticuerpos (59).

El uso potencial del complemento como adyuvante en vacunas fue sugerido por Dempsey y colaboradores (60), ellos demostraron que ratones vacunados con un antígeno modelo (lisozima del huevo de gallina) unido a tres copias del C3d murino, aumentó más de 1000 veces la eficacia de la inmunización. Posteriormente estudios como el de Test y colaboradores, demostraron que con la aplicación de conjugados covalentes de C3d y el polisacárido capsular del *Streptococcus pneumoniae* del serotipo 14 (PPS14) se obtuvieron títulos de anticuerpos más altos que en aquellos ratones inmunizados solamente con PPS14 (61). Además, la inmunización genética con C3d como un adyuvante molecular, ha demostrado inducir anticuerpos hacia una amplia gama de patógenos virales, incluyendo

virus influenza (62, 63), virus de inmunodeficiencia humana (64) y virus de sarampión (65).

Por estudios de fragmentación química y mapeo de péptidos, se identificó el sitio mínimo de unión de C3d a CR2, denominado P28. Éste estimula la proliferación linfocitos B en reposo o líneas de linfocitos B ^{CR2+} con una respuesta dosis dependiente (66). También se ha documentado que P28, puede sustituir completamente la función de C3d en el incremento de la respuesta inmunológica. La evaluación de una vacuna ADN en contra del virus de la hepatitis B variando el número de repetidos del adyuvante P28, mostró que la se obtenía una mejor respuesta en las vacunas que contenían tres y cuatro repetidos de P28 (67). Otro estudio mostró que el acoplamiento del antígeno Env (gp120) del virus de inmunodeficiencia humana a cuatro copias de P28, incrementa la respuesta T-dependiente de las células B, ya sea con proteínas purificadas o con plásmidos (57). Finalmente, una vacuna ADN contra del virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino unido a repetidos del adyuvante P28, mostró un incremento en la respuesta inmune con seis o más repetidos de este péptido (68).

III. HIPÓTESIS

El uso de una vacuna de ADN que codifica para el epítipo lineal G5 de la glicoproteína del RABV, fusionado al adyuvante P28 derivado de la proteína C3d (C3d-P28), aumentará la producción de VNAs, en comparación con la vacuna de ADN pGQH que codifica para la glicoproteína completa, además de conferir protección frente al reto.

IV. OBJETIVOS

GENERAL

Construir una vacuna ADN que contenga la secuencia del epítipo lineal G5 fusionado a la secuencia del adyuvante C3d-P28, evaluar la respuesta inmune humoral y la protección inducida en un modelo murino de infección con el virus de la rabia.

PARTICULARES

1. Construir dos vacunas ADN en el plásmido de expresión eucarionte pVAX1, una incluye la secuencia que codifica para el epítipo lineal G5 (vacuna pVaxG5) y la otra incluye la secuencia de G5 y la secuencia de C3d-P28 (vacuna pVaxF1).
2. Evaluar la expresión del epítipo lineal G5 y del adyuvante molecular C3d-P28 *in vitro*.
3. Evaluar la respuesta inmune de VNAs, en ratones BALB/c inmunizados con pVaxG5, pVaxF1 y con la vacuna control pGQH.
4. Evaluar el nivel de protección ante el reto con virus patógeno (CVS) en ratones inmunizados con pVaxG5, pVaxF1 y con la vacuna control pGQH.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico y plásmido.

Cepas Bacterianas. *Escherichia coli* DH5 α (SupE44 ∇ lac 169 ϕ 80 lac Z ∇ M 15 hsd R17 recA1 endA1 gyrA 96thi- 1re1A1; GIBCO $\text{\textcircled{R}}$).

Cepas Virales. Virus Pasteur (PV) es una cepa de referencia que se empleó para los ensayos de seroneutralización. Virus de Reto (CVS) es una cepa patógena de referencia que se empleó en los ensayos de reto en ratones.

Líneas Celulares. *BHK-21* (ATCC No. CCL-10), fibroblastos de riñón de hámster Sirio, susceptible a la infección por el RABV. Se propagó, manteniéndolas con medio MEM suplementado con 8% de suero fetal bovino (SFB + antibiótico-antimicótico, HEPES, bicarbonato de sodio, piruvato de sodio y glutamina). Para los ensayos de infección se manejó el mismo medio, pero sin suero a una temperatura de 37° C con una atmósfera de CO₂ al 5%

Plásmido. pVAX1, es un vector de clonación diseñado para su uso en el desarrollo de vacunas ADN. Fue construido en apego al documento de la Administración de Drogas y Alimentos (FDA) sobre los puntos a considerar en plásmidos usados para vacunas ADN con el fin de prevenir enfermedades infecciosas (Figura 1).

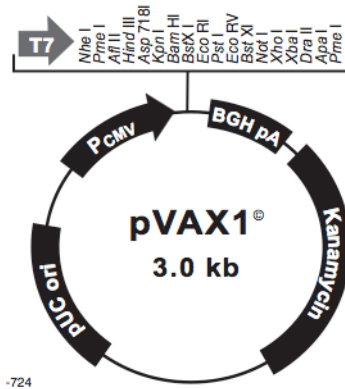


Figura 1.- Mapa del plásmido pVAX1® que se usó como vector vacunal.

Ingeniería Genética.

Todas las técnicas empleadas en el proceso de ingeniería genética ó tecnología del ADN recombinante se llevaron a cabo de acuerdo con los protocolos y recomendaciones de Sambrook y colaboradores (69). Mediante la reacción en cadena de la polimerasa por punto final (PCR), se obtuvieron las secuencias codificantes para el epítipo lineal G5 y el adyuvante molecular P28. Todos los oligonucleótidos diseñados para la obtención del epítipo G5, así como de P28 poseían sitios de restricción que fueron necesarios para llevar a cabo su inserción sitio-dirigida en el plásmido pVAX1®. Se generaron dos plásmidos el primero contiene la secuencia que codifica G5 (pVaxG5) y el segundo contiene la secuencia que codifica para G5 y una secuencia de P28 (pVaxF1). Es importante mencionar que, durante el diseño y la construcción del plásmido de interés, se subclonó el ADN codificante del adyuvante P28 orientado hacia el extremo carboxilo de la proteína de fusión.

Síntesis de secuencia G5.

La secuencia G5 empleada en el diseño de las vacunas, está formada por la región del péptido señal (PS aa 1-19) y el epítipo lineal G5 (aa 244- 281) de la glicoproteína del

RABV, reportado previamente (34). Las secuencias codificantes de los fragmentos PS y G5 (ATG GTT CCT CAG GTT CTT TTG TTT GTA CTC CTT CTG GGT TTT TCG TTG TGT TTC GGG CAA ACA TCA GAT GAG ACC AAA TGG TGC CCT CCA GAT CAG TTG GTG AAT TTG CAC GAC TTT CGC TCA GAC GAG ATT GAG CAT CTC GTT GTG GAG GAG TTA GTC AAG AAA AGA GAG), se obtuvieron de la base de datos GenBank basados en el genoma de la cepa CVS del RABV.

Para sintetizar dicha secuencia (PS unida a G5) se empleó la estrategia de PCR de extensión solapada, la cual se describe brevemente a continuación. Se diseñaron dos pares de iniciadores (primers) (G5AFw-G5BRv y G5CFw-G5DRv) los cuales incluían los sitios de restricción Xho I y Hind III respectivamente (Tabla 1). Los primers tenían secuencias complementarias en una región de aprox. 20 bases (Figura 2). La amplificación se llevó a cabo en tres partes. En la primera se usaron los primers G5AFw y G5BRv para dar origen al primer fragmento denominado AB. En una segunda corrida se usaron los primers G5CFw y G5DRv para dar origen al segundo fragmento denominado CD. Debido a que la temperatura de fusión (T_m) de cada par de primer era diferente, se estandarizó ésta mediante un gradiente de temperatura y se determinó que a 51° C se obtenían bandas específicas. Finalmente se amplificó la secuencia PS-G5 completa usando los primers G5AFw y G5DRv y los fragmentos AB y CD como templados y se le denominó G5 (figura 2).

Generación del plásmido vacunal pVaxG5.

Una vez obtenida la secuencia G5, por PCR se le incluyeron en el extremo 5', además del sitio de restricción para la enzima Xho I, un codón de inicio de la transcripción, mediante el uso del primer FpVaxFw. En el extremo 3' se incluyó un codón de paro de la transcripción

y una secuencia reconocible por la enzima de restricción XbaI mediante el uso del primer CpVaxG5Rv, lo anterior para permitir la clonación sitio dirigida en el plásmido comercial pVAX1[®]. El producto se corrió en una electroforesis al 1.5% de agarosa, se verificó el tamaño (189 pb), se cortó del gel y se purificó mediante el kit QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen cat. 28704).

Tanto G5 como pVAX1[®] fueron digeridas con las enzimas XbaI (BioLabs[™] cat. R0145S) y XhoI (BioLabs[™] cat. R0146S) siguiendo las instrucciones del fabricante, se corrieron en una electroforesis para verificar y purificar ambos productos. Finalmente se ligaron mediante una Ligasa de ADN T4 (ThermoScientific. cat. K1422) siguiendo las recomendaciones del fabricante. El producto de ligación se usó para transformar células competentes *E. coli* DH5 α (Figura 2). Una vez obtenidas las colonias, se extrajo el plásmido de cada una y se determinaron cuáles eran positivas mediante su longitud molecular (3.2 kb aprox.) y secuenciación de Sanger. Al plásmido vacunal resultante se le denominó pVaxG5.

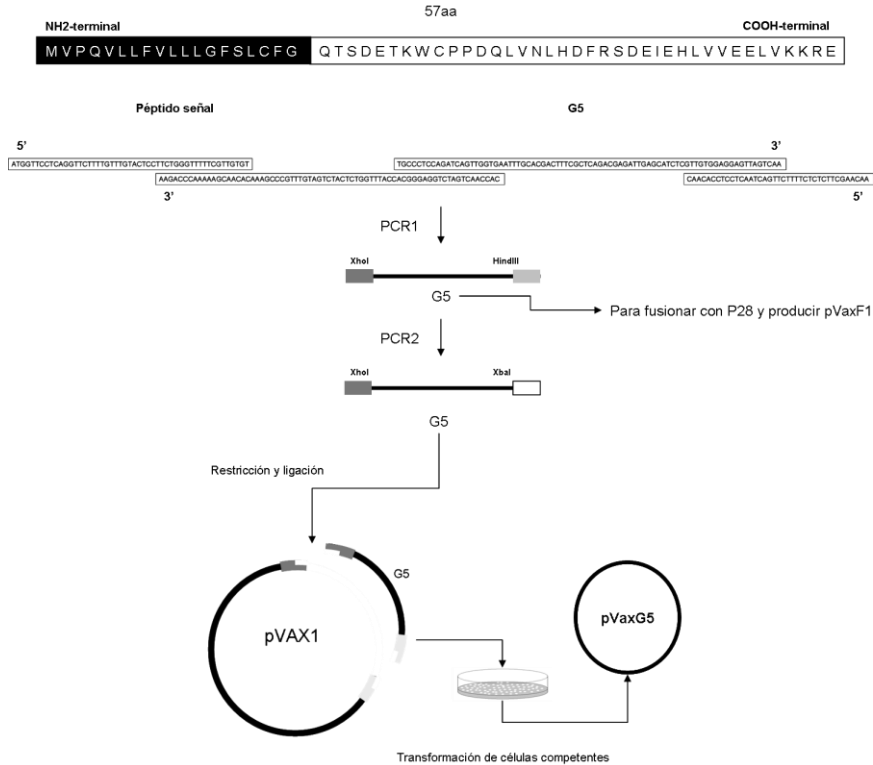


Figura 2. Producción del plásmido vacunal pVaxG5. Secuencia aminoacídica y de nucleótidos del epítipo lineal G5. PCR1: síntesis de G5 para unirse a P28. PCR2: amplificación de G5 para insertarse de manera sitio dirigida en el plásmido pVAX1®.

Síntesis de secuencia P28.

Por otro lado, la secuencia que correspondió al P28 estuvo conformada por una secuencia de unión (linker) ((G₄S₂)₂) y la secuencia de P28 murino (57). La secuencia codificante para el linker y P28 es la siguiente: GGA TCT GGA GGG GGC GGA TCT GGA GGG GGC GGA TCT GGA TCT AAG TTT CTG ACA ACA GCC AAA GAT AAA AAC CGC TGG GAG GAC CCT GGA AAA CAG CTC TAC AAC GTA GAG GCC ACA TCC TAC GCC. Para sintetizar esta molécula se usó la misma estrategia de PCR de extensión solapada usada para generar a G5. Los primers empleados (P28TFw y P28TRv) empalmaron en una región intermedia de 20 bases y amplifican una secuencia de 126 pb (templado P28). Por PCR se amplificó la secuencia P28 usando una T_m de 64.7° C, se

corrió una electroforesis del producto en un gel de agarosa al 1.5%, se verificó el tamaño y se le agregaron el sitios de restricción HindIII (5') y XbaI (3') para fusionarlo con G5 y su eventual inserción en el plásmido pVAX1[®], mediante una segunda PCR usando los primers P28AFw y FpVaxRv respectivamente (Figura 3).

Generación del plásmido vacunal pVaxF1.

A la secuencia G5 obtenida anteriormente se le agregaron por PCR, un sitio de restricción para la enzima Xho I y un codón de inicio de la transcripción en el extremo 5' mediante el uso del primer FpVaxFw. En el extremo 3' se le agregó un sitio de restricción para la enzima HindIII por medio del primer G5DRv. Una vez obtenida ésta secuencia se fusionó a la secuencia P28 como se describe a continuación.

Se digirieron G5 y P28 mediante la enzima HindIII, se corrió una electroforesis con ambos productos y se purificaron del gel. Posteriormente se ligaron mediante la T4 ADN ligasa y se amplificó la fusión G5-P28 (F1) por PCR usando los primers FpVaxFw y FpVaxRv. Se verificó el tamaño de F1 (333pb) por electroforesis en gel agarosa al 1.5% y se purificó la banda para su inserción sitio dirigida en el plásmido pVAX1[®] (Figura 3).

Se digirieron tanto F1 como el plásmido pVAX1[®] con las enzimas de restricción XhoI y XbaI, posteriormente se ligaron y el producto se utilizó para transformar células competentes *E. coli* DH5 α (Figura 3). De las colonias resultantes se purificó el plásmido, se corrió una electroforesis en gel de agarosa al 1% para verificar tamaño y se seleccionaron aquellas que tuvieran un retraso electroforético correspondiente a 3.3 kb o mayor al presentado por el plásmido parental. Finalmente, se verificó la secuencia de F1 por secuenciación de Sanger. Al plásmido vacunal resultante se le denominó pVaxF1.

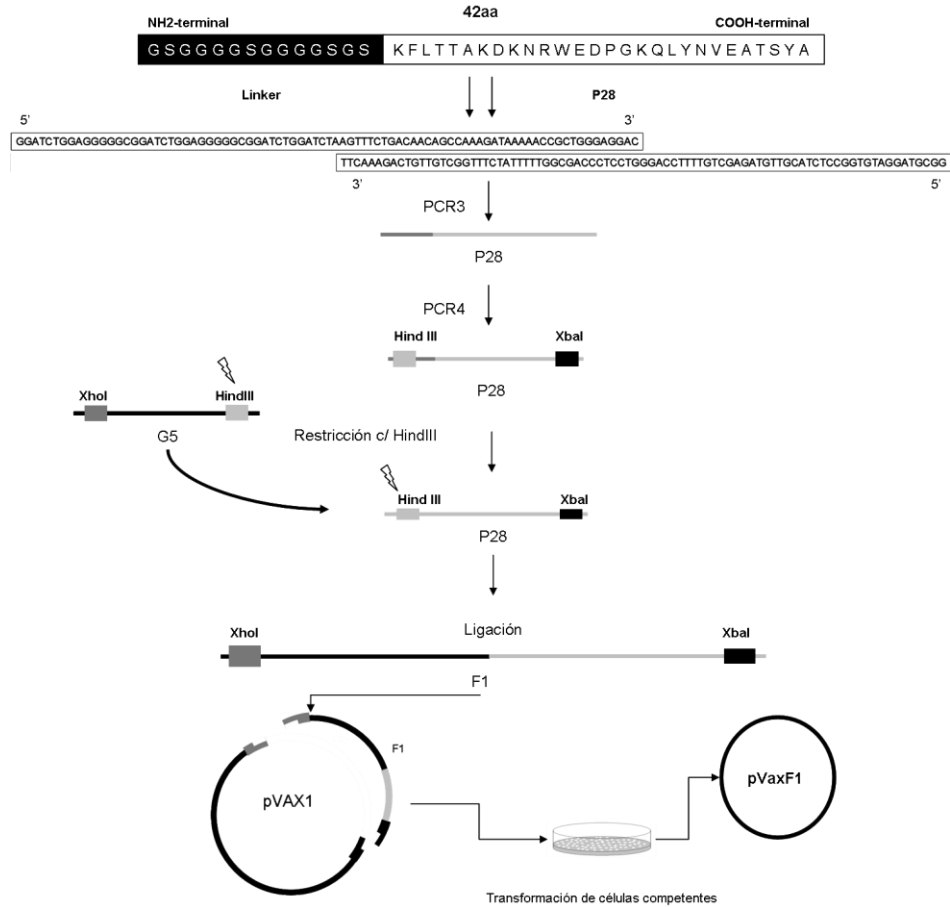


Figura 3. Producción del plásmido vacunal pVaxF1. Secuencia aminoacídica y de nucleótidos del adyuvante molecular P28. PCR3: síntesis de P28. PCR4: amplificación de P28 para unirlos a G5 e insertarlos de manera sitio dirigida en el plásmido pVAX1®.

Los primers usados para la secuenciación son los siguientes: SqpVaxG5P28Fw y SqpVaxG5P28Rv. La secuencia de cada uno de los primers (Tabla 1) se analizó en el programa OlygoAnalyzer 3.1 que está disponible en la dirección <http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>. El diseño de los primers así como la ingeniería genética se realizó bajo la asesoría y supervisión de la Dra. Éricka Pompa Mera de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Centro Médico Siglo XXI, IMSS.

NOMBRE	OLIGONUCLEOTIDOS (5'→3')	Tm	Sitios de restricción y otros
P28Tfw	GGATCTGGAGGGGGCGGATCTGGAGGGGGCGGATCTGGATCTAAGTTTCTGACAACAGCCAAAGATAAAAAACCGCTGGGAGGAC	66.3	No
P28Trv	GGCGTAGGATGTGGCCTCTACGTTGTAGAGCTGTTTTCCAGGGTCTCCAGCGGTTTTATCTTTGGCTGTTGTCAGAAACTT	66.3	No
P28Afw	TATAAGCTTGGATCTGGAGGG	41.6	Hind III
G5Afw	TTTCTCGAGATGGTTCCTCAGGTTCTTTTGTGTACTCCTCTGGGTTTTTCGTTGTGT	52.7	Xho I
G5BRv	CACCAACTGATCTGGAGGGCACATTTGGTCTCATCTGATGTTTCCCGAAACACAACGAAAAACCCAGAA	52.7	No
G5CFw	TGCCCTCCAGATCAGTTGGTAATTTGCACGACTTTCGCTCAGACGAGATTGAGCATCTCTGTTGGAGGAGTAGTCAA	51.7	No
G5DRv	AACAAGCTTCTCTCTTTTCTGACTAACTCCCAAC	51.7	Hind III
FpVaxFw	GGGCTCGAGACCATGGTTCCTCAG	36.7	Xho I, ATG de inicio y secuencia de 12 n de G5
FpVaxRv	AATCTAGATCAGTCGACGGCGTAGGAT	33.4	Xba I, STOP, Sal I, secuencia de 10 n de P28.
SqpVaxGSP28Fw	GGATCCACTAGTCCAAGTGTGG	56.8	Inicia la amplificación en sitio BamH I del pVAX1
SqpVaxGSP28Rv	TAGAAGGCACAGTCGAGGCT	58	Inicia amplificación reversa en sitio BGH Reverse priming site de pVAX1

Tabla 1. Oligonucleótidos empleados en el proceso de síntesis de los plásmidos vacunales pVaxG5 y pVaxF1.

Producción de las vacunas.

Las bacterias *Escherichia coli* DH5 α transformadas con los plásmidos pVaxG5 y pVaxF1 se cultivaron en placas de agar con medio BHI a 37° C con 50 μ g/mL de kanamicina durante toda la noche. Posteriormente se tomó una asada y se cultivó en 5 ml de medio BHI caldo con 50 μ g/mL de kanamicina, una vez que alcanzó la fase logarítmica de crecimiento (Densidad óptica [DO]₆₀₀ = 1.0) se tomaron 200 μ L y se colocaron en 500 mL de medio BHI caldo con 50 μ g/mL de kanamicina para su cultivo durante toda la noche en agitación constante (100 rpm). Posteriormente se cosechó y mediante el uso del EndoFree® Plasmid Mega kit (QIAGEN®) se purificaron los plásmidos vacunales. Para determinar la pureza e integridad de los plásmidos se realizaron, en cada caso, electroforesis en gel de agarosa al 1% y análisis espectrofométricos. El plásmido pGQH (control) que codifica para toda la glicoproteína, fue producido como lo reportó Tesoro-Cruz y colaboradores (42).

Transfección.

Para verificar la expresión de cada una de las proteínas G5, C3d-P28 y G se realizó la transfección de la línea celular BHK21 con su plásmido correspondiente pVaxG5, pVaxF1 y pGQH, mediante el uso de Lipofectamina (Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent

Invitrogen) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Brevemente: Para cada plásmido se emplearon 8 µg de ADN y se mezclaron con 50 µL de medio Opti-MEM (Gibco™) (mezcla A). Por otro lado, se agregaron 6 µL de Lipofectamina a 50 µL de medio Opti-MEM (mezcla B). Ambas mezclas se combinaron y se incubaron a temperatura ambiente por 15 min. Este complejo se agregó a una monocapa de células BHK-21 y se incubó por 5 horas a 37° C en 5% de CO₂. Posteriormente, el complejo fue removido y remplazado con medio MEM suplementado y se incubó por 48 hrs a 37° C con 5% de CO₂. Finalmente, las proteínas fueron obtenidas de los sobrenadantes y los lisados celulares.

Detección de las proteínas recombinantes.

La técnica de dot-blot fue empleada para detectar cada una de las proteínas recombinantes. Brevemente, en una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (BIO-RAD) se aplicaron por goteo 20 µg de proteínas totales (obtenidas previamente de la transfección) y se dejó secar. Posteriormente, se bloqueó la membrana con buffer TTBS (Tris 50 mM, NaCl 0.5 M y Tween-20 0.05%) y 5% de leche deslactosada (buffer de bloqueo) durante una hora a temperatura ambiente y se lavó con buffer TTBS (buffer de lavado). Posteriormente se llevó a cabo la inmuno-detección. Para el caso de la detección de la G5 se usó como primer anticuerpo la inmunoglobulina anti-rabies-human (Berirab® P, CSL Behring) a una dilución de 1:100 y para la detección de P28 se empleó un anticuerpo anti-C3d-Goat (R&D Systems) a una dilución de 1:1500. Los anticuerpos fueron diluidos con buffer de bloqueo y las membranas se incubaron con el primer anticuerpo durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente se lavaron las membranas tres veces (10 min. en agitación por lavado). Después del lavado, las membranas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente con su respectivo anticuerpo secundario, ya sea con HRP-Goat anti-human IgG

(ZyMax™ ZYMED®) a una dilución 1:5000 o con HRP-Rabbit anti-goat IgG (ZyMax™ ZYMED®) a una dilución 1:3000. Las membranas se lavaron 3 veces y se reveló con diaminobencidina al 0.03% y H₂O₂ al 0.1%.

Inmunización y reto.

Se inmunizaron 3 grupos de ratones hembras BALB/c de 21 días de edad con los plásmidos: pVaxG5 (n = 9), pVaxF1 (n = 10), pGQH (n = 9) y un grupo control negativo inoculado con PBS (n = 8). La inmunización constó de 2 dosis (día 1 y un refuerzo al día 30), cada una de 20 µg de ADN plasmídico diluidos en 50 µL de PBS, por vía intramuscular. A cada ratón se le tomó una muestra de sangre en los días 15, 45 y 90. Al día 91, los ratones se retaron vía intracerebral con 22 DL_{50%} de la cepa CVS de virus rábico. Los ratones fueron observados por 21 días, monitoreando diariamente la sobrevivencia y los signos clínicos de cada grupo. Cualquier muerte ocurrida durante los tres primeros días fue considerada inespecífica de la infección.

Los ratones que presentaron parálisis se sacrificaron inmediatamente así como los animales que sobrevivieron al periodo de 21 días post reto. La presencia del virus en los ratones fue confirmada por inmunofluorescencia utilizando un anticuerpo contra el virus. Brevemente se hizo una impronta del cerebro en un portaobjetos, se fijó la muestra con una solución fijadora (Cytifix/Cytoperm™ BD), se delimitó el área con un lápiz de cera, se agregó una gota del anticuerpo anti-nucleoproteína de RABV conjugado a isotiocianato de fluoresceína (FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, FUJIREBIO™) en una dilución 1:128 y se dejó incubar por 45 min. a 37° C. en condiciones de humedad. Pasado el tiempo, se lavó la muestra con agua corriente y se agregó una gota de solución de montaje (glicerina-PBS al

50% pH 8.3). Finalmente se observó la laminilla al microscopio con luz UV para determinar la presencia del virus evidenciado por el anticuerpo.

Ensayo de seroneutralización del virus de la rabia (RRFF).

Es el método estándar que se emplea para la titulación de anticuerpos neutralizantes en contra del RABV (VNAs) a nivel mundial y está avalada por la OMS (70). Brevemente, una vez obtenidos los sueros de los animales se descomplementaron a 56° C durante 30 min. En una placa de 96 pozos se hicieron 8 diluciones triples de cada suero con medio de cultivo sin suero (50:100) dejando un volumen final de 100 µL, cada dilución se incubó con 50 µL de virus PV que contenía 30 unidades formadoras de focos fluorescentes (UFFF) durante una hora a 37° C en atmósfera de CO₂ al 5%. Posteriormente, la mezcla se colocó en otra placa de 96 pozos, previamente sembrada con 30,000 células BHK-21/pozo y se dejó incubar por 24 hrs a 37° C en atmósfera CO₂ al 5%. En cada prueba se colocó un suero de referencia que tiene 10 UI/mL en diluciones triples, un control de virus que consistía en 30 UFFF del virus con células y un control de células sin inóculo y sin suero.

Pasadas las 24 hrs, se retiró el sobrenadante y se fijaron las células con Cytifix/Cytoperm™ BD y se incubó por 45 min a 4° C. A continuación, se retiró la solución fijadora y se agregaron 60 µL del anticuerpo anti-nucleoproteína de RABV conjugado a Isotiocianato de fluoresceína (FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin, FUJIREBIO™), y se dejó incubar por 45 min a 37° C en condiciones de humedad y en agitación orbital (100 rpm). Pasado el tiempo se decantó el contenido de la placa, se lavó con agua destilada y se le agregó a cada pozo 80 µL de solución de montaje. Finalmente se contaron los focos fluorescentes en un microscopio invertido con luz ultravioleta. Los resultados se expresaron en Unidades

Internacionales por mililitro (UI/mL) tomando como base la reducción de focos fluorescentes producida por un suero de referencia con título conocido (10 UI/mL).

Evaluación de signos clínicos.

Después del reto, las OMS recomienda mantener un periodo de observación diaria de los animales de por lo menos 21 días y determinar la presencia de los signos clínicos de rabia: Pelaje erizado, postura encorvada y temblores cuando se sostiene al animal en el aire, poca coordinación de las patas traseras, parálisis y postración (cerca de la muerte) (70). Dependiendo de la severidad de la enfermedad se asignaron valores a cada uno de los signos mencionados tomando como referencia una clasificación descrita por Takayama-Ito y colaboradores: sin signos de rabia (Puntuación 0), pelaje erizado (Puntuación 1), postura encorvada (Puntuación 2) y signos tempranos de parálisis (Puntuación 3) (71). Dichos resultados se graficaron y analizaron para determinar la severidad de la enfermedad en los diferentes grupos.

Ensayo de proliferación

De dos ratones vacunados con cada plásmido (pVaxG5, pVaxF1 y pGQH) y PBS y que no participaron en el reto, se obtuvieron los bazos 116 días después del refuerzo. Los esplenocitos fueron marcados con una solución de éster de succinimidilo de carboxifluoresceína (CFSE) 1 μ M en PBS-BSA al 0.1%. Posteriormente, en una placa de 96 pozos se sembraron 5×10^5 células en medio RPMI suplementado (10% SFB, antibióticos-antimicóticos, piruvato y β mercapto-etanol) por pozo. Se estimularon las células con 0.25 UI (en 100 μ L de medio RPMI sin suplemento) de la vacuna antirrábica

VERORAB (Wistar strain Rabies, PM/W1, 38-1503-3M) por pozo. En el caso del control negativo se usó medio RPMI sin suplemento. Todo el experimento se realizó por triplicado incubando por 96 hrs a 37° C con CO₂ al 5%. Después de la incubación, las células fueron cosechadas, lavadas con PBS y teñidas con el marcador de viabilidad Viobility™ Fixable Dyes viable marker (Miltenyi Biotec Cat. 130-109-814). Posteriormente las células se fijaron con una solución de paraformaldehído al 2% y para diferenciar entre células B, células T CD4⁺ y células T CD8⁺ se tiñeron con un coctel de anticuerpos de ratón que incluye: antiCD19-PE directo (clona: 6D5), antiCD4-PE-Cy7 diluido 1:250 (clona: REA604) y antiCD3-PE-Cy5 directo (clona: REA641) (Miltenyi Biotec). Finalmente, las células fueron resuspendidas en PBS para su inmediata adquisición en un citómetro de flujo MacsQuant Analyzer 10. Los datos fueron analizados con el software FlowJo V.10.

Análisis estadísticos.

Los datos fueron expresados como Media \pm DESVES en el caso de las seroneutralizaciones y los ensayos de proliferación. Se empleó ANOVA de uno o dos vías para el análisis intra e inter grupo. Las comparaciones post hoc se hicieron usando la prueba de Tukey. La evaluación de las diferencias en los datos de la curva de sobrevida fue analizada con una prueba log-rank. Todos los análisis fueron llevados a cabo con el software GraphPad Prism. V7.0. Las diferencias se consideraron significativas cuando el valor de P fue <0.05.

VI. RESULTADOS

Síntesis de la secuencia del epítipo lineal G5 del virus de la rabia

La obtención de la secuencia sintética de G5 (PS+G5) resultó en un producto de 189 pb y fue de la siguiente manera: de la PCR de extensión traslapada, se obtuvo un producto de 111 pb usando los primers G5AFw-G5BRv el cual se denominó producto AB, y con los primers G5CFw-G5DRv se obtuvo un producto de 99 pb denominado CD. Para obtención del producto final de 189 pb se realizó otra PCR usando los primers G5AFw y G5DRv y como templado los productos AB y CD.

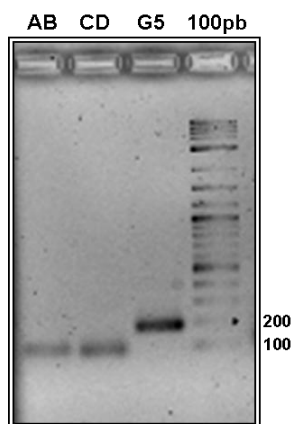


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. AB: fragmento de 111 pb. CD: fragmento de 99 pb. G5 es un producto de 189 pb resultado de la unión del fragmento AB y CD por PCR de extensión solapada.

Una vez que se corroboró la síntesis de G5 mediante el tamaño del producto y la posterior secuenciación, se procedió a insertar dicho producto en el plásmido pVAX1[®] como se describe a continuación: de la PCR con los primers FpVaxFw y CpVaxG5Rv se obtuvo un producto de 195 pb (debido a la adición de las señales de inicio y fin de la transcripción) que al igual que el plásmido pVAX1[®] se digirió con las enzimas XhoI y XbaI, se corrió una

electroforesis de los productos, se purificaron y se realizó otra electroforesis para verificar su pureza y dejar dichos productos listos para ligar (Figura 5).

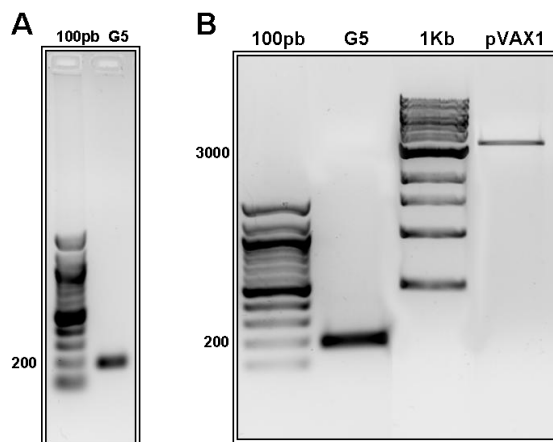


Figura 5. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. A: Producto de PCR de 195 pb que corresponde a la secuencia de G5 con señales de inicio y fin de la transcripción. B: ADN de G5 y pVAX1 digeridos con las enzimas Xho I y Xba I, puros y listos para la ligación.

De las células *E. coli* DH5 α transformadas con el plásmido pVAX1+G5 se seleccionaron 14 clonas al azar y se les extrajo el plásmido. La electroforesis mostró que 4 plásmidos (C2, C6, C8 y C12) tenían un retraso en comparación con el plásmido parental pVAX1 (Figura 6).

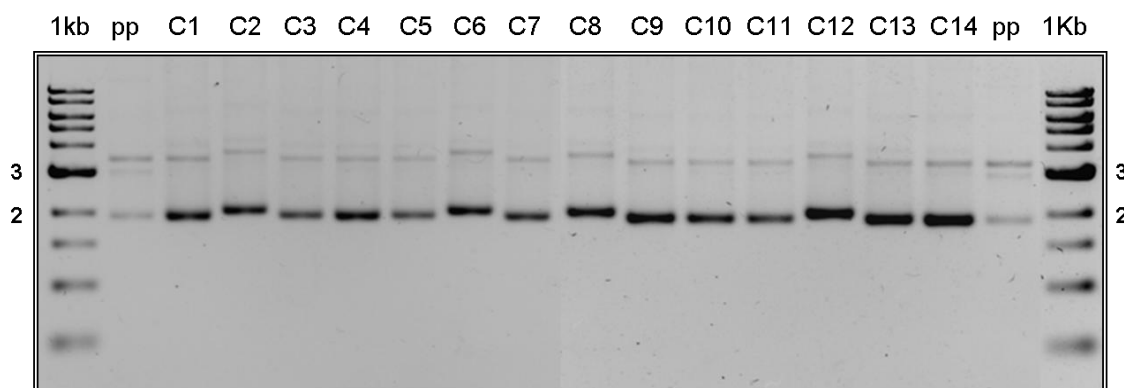


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. C1-C14: Plásmidos extraídos de las 14 clonas seleccionadas al azar. C2, C6, C8 y C12 mostraron un retraso electroforético. pp: plásmido parental (pVAX1 vacío). 1Kb: marcador de longitud molecular en kilobases.

Este retraso en el corrimiento electroforético, en las clonas 2,6,8 y 12 sugiere la inserción del fragmento G5 en el plásmido pVAX1. Después de realizar una PCR con primers específicos para amplificar el fragmento G5 y la secuenciación de los productos de los plásmidos arriba mencionados, se obtuvo que el tamaño de los amplificados corresponde al tamaño del fragmento G5, además la secuenciación indica que la secuencia es correcta (Figura 7). De esta forma se obtuvo el plásmido vacunal que se denominó pVaxG5.

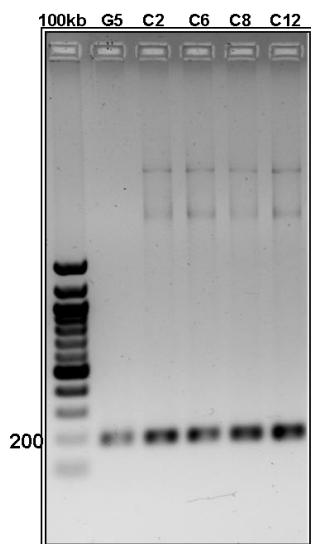


Figura 7. A: Electroforesis de la amplificación del control positivo G5 (189pb) y plásmidos de las clonas 2, 6, 8 y 12.

Síntesis de la secuencia del adyuvante molecular C3d-P28 murino.

Se sintetizó un templado de 126 pb que corresponde a la secuencia de adyuvante molecular C3d-P28 mediante una PCR de extensión solapada. Y posterior a la adición de los sitios de restricción Hind III (5'), XbaI y una secuencia para el codón de paro en el extremo 3', se obtuvo un producto con una longitud de 144 pb. (Figura 8A).

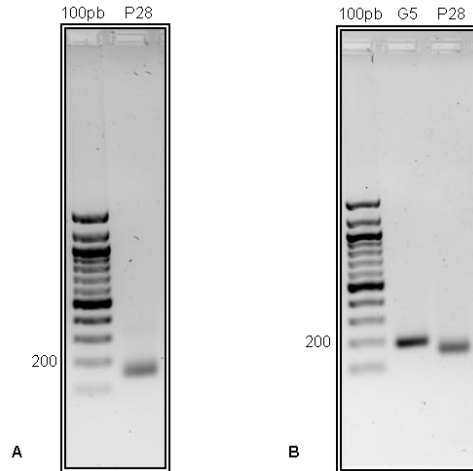


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. A). Perfil electroforético del fragmento P28 (144 pb) sintetizado por PCR de extensión solapada. B). G5 y P28 digeridos con HindIII y purificados, listos para ligarse.

Se empleó la enzima HindIII para digerir G5 y el C3d-P28, cada producto fue purificado, verificado por electroforesis (Figura 8B) y finalmente ligados. El producto de esta ligación denominado F1, se amplificó por PCR y se corrió en una electroforesis. Una vez verificado el tamaño de 333 pb (la suma de C3d-P28 y G5) (Figura 9A), se digirió al igual que el plásmido pVAX1, con las enzimas XhoI y XbaI (Figura 9B) para su posterior ligación. El producto de ligación fue usado para transformar células competentes *E. coli* DH5a.

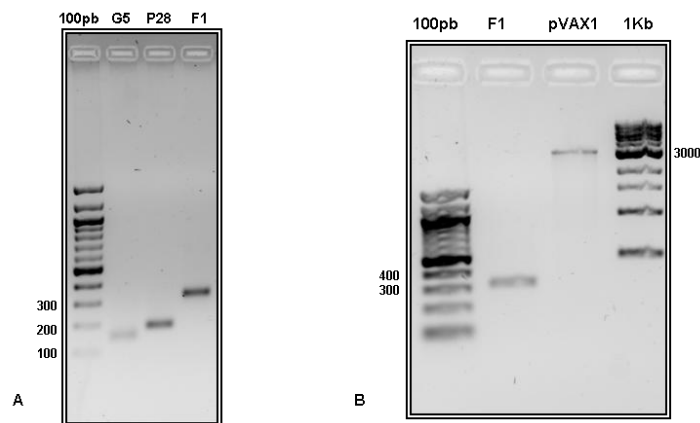


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. A: Productos G5 (189 pb) y P28 (144 pb) sintetizados por PCR digeridos y ligados (F1). B: F1 (333 pb) y pVAX1 digeridos con XhoI y XbaI y purificados.

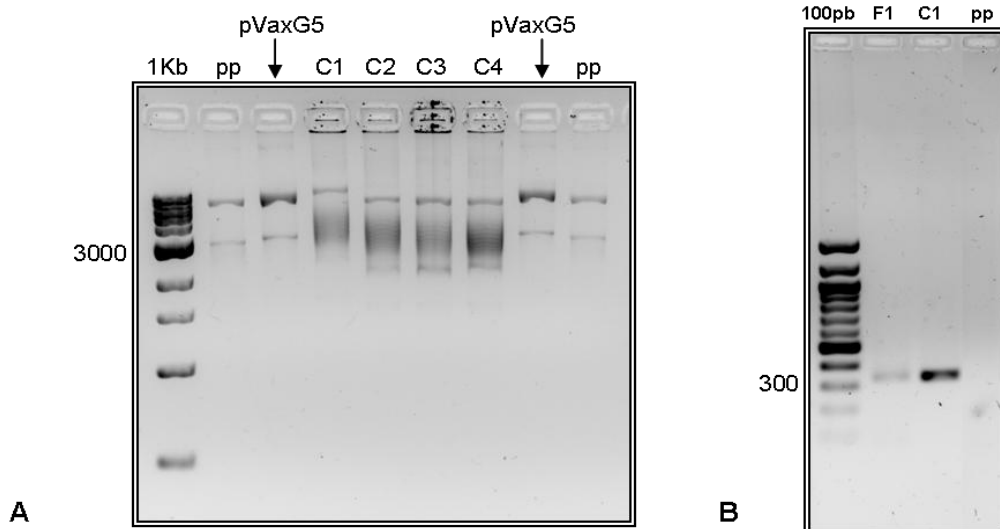


Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1% (A) y 0.8% (B). A: 1Kb=Marcador de peso molecular para muestras de alto peso. pp= plásmido parental pVAX1. C1-C4: plásmidos de las clonas obtenidas. B: 100pb= marcador de peso molecular para muestras de bajo peso. F1= producto de PCR de la fusión de G5 con C3d-P28. C1: Producto de PCR amplificado de la clona con retraso electroforético.

Se obtuvieron 4 clonas después del proceso de transformación. En la Figura 10A se puede observar que la clona 1 muestra un claro retraso electroforético, con respecto al plásmido parental pVAX1, incluso con el plásmido pVaxG5, lo cual nos indica que la inserción fue exitosa. Posterior a la amplificación por PCR con primers específicos para amplificar el fragmento F1, en el carril de la clona 1 (C1) se aprecia una amplificación (Figura 10B). Las clonas C2 aC4 no mostraron el mismo retraso (Figura 10A), y al correr la PCR no hubo amplificación. Los productos de PCR fueron secuenciados y se observó que la secuencia de la clona 1, es la que mantuvo homología con la secuencia original de G5-C3d-P28. De esta forma se confirmó que la secuencia es correcta y se designó como pVaxF1 al plásmido vacunal que contiene el epítipo lineal G5 y el adyuvante molecular C3d-P28.

Producción de Vacunas

De cada plásmido vacunal se realizó un cultivo en 500 mL de medio BHI caldo-kanamicina durante toda la noche, y su correspondiente extracción-purificación, mediante el uso del Kit EndoFree® Plasmid Mega kit (QIAGEN®). Se obtuvieron 1.5 mL de cada plásmido a una concentración 1.4 µg/µL del plásmido pVaxG5, 1.9 µg/µL del plásmido pVaxF1 y 3.2 µg/µL del plásmido pGQH (pGQH fue producido en medio BHI caldo-ampicilina). La electroforesis mostró la integridad y el tamaño adecuado de cada plásmido (Figura 11).

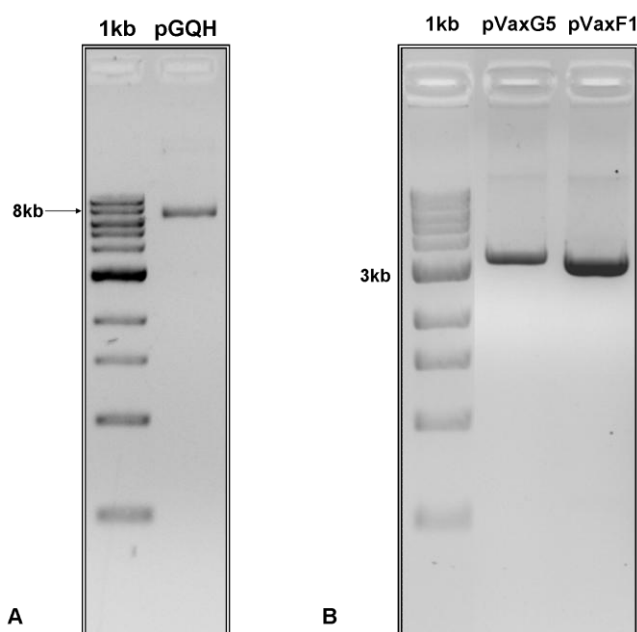


Figura 11. Electroforesis en gel al 0.8% de los plásmidos vacunales A) pGQH (7kb): codifica para el gen completo de la glicoproteína del RABV (530aa). B) pVaxG5 (3.1kb): codifica para el epítipo lineal G5 de la glicoproteína del RABV (57aa). pVaxF1 (3.3kb): codifica para G5 y el adyuvante molecular C3d-P28 (99aa).

Expresión de proteínas recombinantes.

De la transfección de células BHK-21 con los plásmidos pVaxG5, pVaxF1 y pGQH, se obtuvieron las proteínas totales de los sobrenadantes y fueron evaluados mediante dot blot para verificar el reconocimiento de cada uno de los epítipos (G5, C3d-P28 y G) por anticuerpos específicos (anti G de rabia y anti C3d murino) (Figura 12).

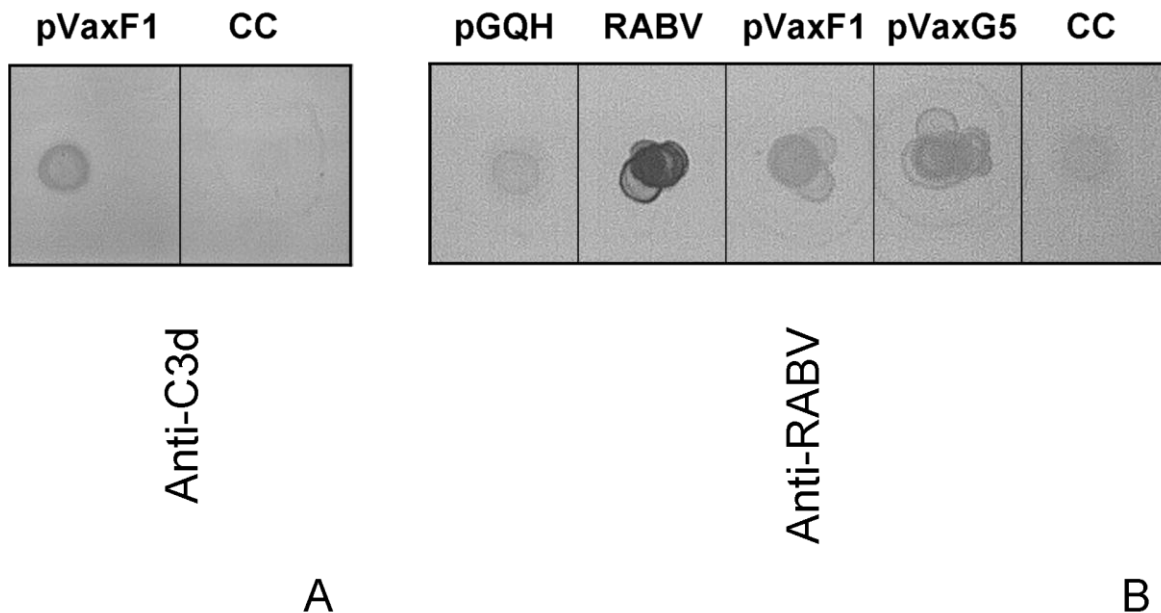


Figura 12. Dot Blot en papel de nitrocelulosa 0.45 μ m. Cada punto contiene 20 μ g de proteínas totales. pVaxF1: codifica para G5 y C3d-P28. pVaxG5: codifica para G5. pGQH: codifica para toda la glicoproteína del RABV. RABV: virus rabia. CC: control de células sin transfectar. Anticuerpos: A) Anti-C3d (1:1500). B) Anti-RABV diluido 1:100.

Después del revelado se observa que el anticuerpo anti C3d detecta la proteína recombinante obtenida de la transfección con el plásmido pVaxF1 (Figura 12A). Por otro lado, la proteína recombinante G5 resultante de la transfección con pVaxF1, pVaxG5 fue detectada por el anticuerpo anti RABV, así como la glicoproteína G, resultado de la transfección con el plásmido pGQH (Figura 12B).

Inmunización y reto.

Como parte del esquema de inmunización se obtuvieron en promedio 500 μ L de sangre de cada animal y de allí se obtuvieron alrededor de 100 μ L de suero que fue almacenado a -70° C hasta su uso en la prueba de seroneutralización. En cuanto a la inmunización, se

inocularon 20 μg de plásmido vacunal diluido en 50 μL de PBS pH 7.0 vía IM. En el reto, se administraron 22DL_{50%} vía IC en un volumen de 30 μL . Los tiempos se muestran en el siguiente esquema (Figura 13):

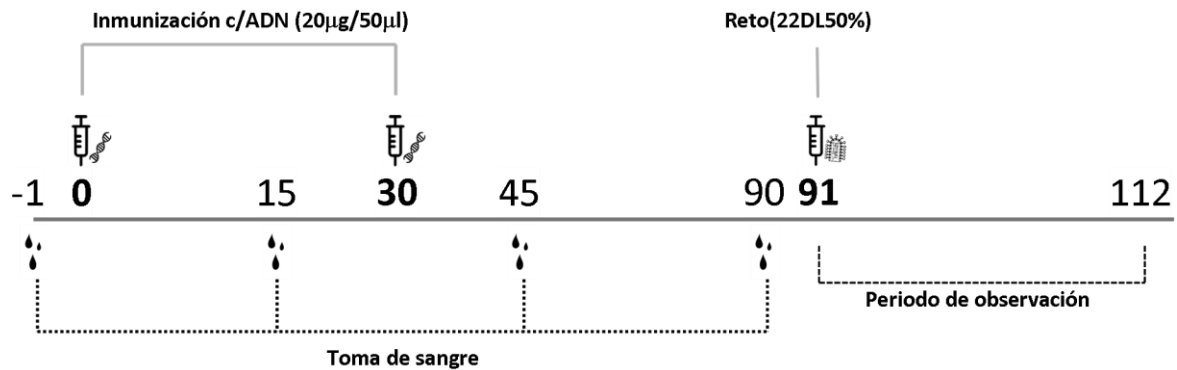


Figura 13. Esquema de inmunización y reto. Se tomó una muestra de sangre pre-inmune (día -1), al día 15, 45 y 90. Se inmunizó al inicio (día 0) y se aplicó un refuerzo al día 30. La inoculación de la cepa de reto vía intracraneal, se realizó al día 91. Posteriormente los signos clínicos de los animales fueron observados y registrados durante 21 días.

Ensayo de seroneutralización.

Los sueros fueron descomplementado a 56°C/30 min y se utilizaron para los ensayos de seroneutralización de la infección del RABV en células BHK-21. Después de determinar el número de UI/mL en cada uno de los ratones, se obtuvieron los resultados mostrados en la figura 14.

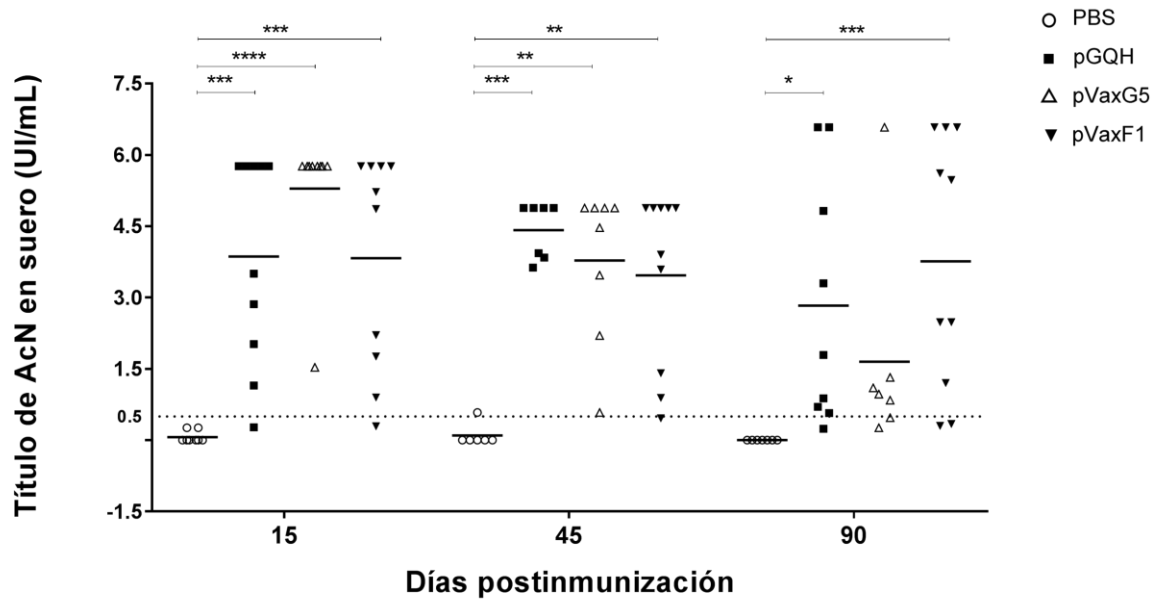


Figura 14. Número de UI/mL obtenidas en los días 15, 45 y 90 post inmunización. La línea punteada marca 0.5 UI/mL que es el nivel mínimo de VNAs necesarios para considerar que un animal está protegido contra el RABV según la OMS. (*) $P = 0.0157$; (**) $P \geq 0.0020$; (***) $P \geq 0.0002$; (****) $P < 0.0001$.

Como se observa en la gráfica (Figura 14), la mayoría de los animales a los que se les administraron los plásmidos pGQH (9/10), pVaxG5 (9/9) y pVaxF1 (9/10) muestran un nivel de VNAs superior a las 0.5 UI/mL al día 15 post-inmunización. Y el grupo inmunizado con pVaxG5 fue el más alto (5.3 UI/mL \pm 1.4) en comparación a los grupos inmunizados con pGQH y pVaxF1 (3.8 UI/mL $P=0.33$ y 3.8 UI/mL $P=0.31$ respectivamente) al día 15 post-inmunización. Sin embargo, en días posteriores, se observa que el nivel de VNAs en los animales inoculados con pVaxG5 va disminuyendo gradualmente (al día 90, 1.6 UI/mL \pm 2.2). Por otro lado, la inmunización con pVaxF1 indujo una respuesta sostenida de VNAs, manteniendo un nivel de 3.7 UI/mL \pm 2.2 hasta el día 90. Esto también fue observado en los sueros de los animales que recibieron la vacuna pGQH, que codifica para la glicoproteína completa del virus (3.6 UI/mL \pm 2.0). En los

sueros de los animales inmunizados con PBS no se observaron VNAs ($<0.5 \text{ UI/mL} \pm 0.14$) durante todo el ensayo.

Reto

Para determinar si las vacunas pVaxG5 y pVaxF1 protegen frente a una infección por RABV, los animales inmunizados con dichas vacunas fueron infectados por vía IC con $22\text{DL}_{50\%}$ de virus de reto CVS al día 90. Posterior a la infección los animales fueron monitoreados por 21 días llevando un registro de sus signos clínicos y la sobrevivida.

Como se observa en la figura 15, la sobrevivida del grupo inmunizado con pVaxG5 fué del 77%, 27% más en relación al grupo PBS. En los animales inmunizados con pVaxF1 y el grupo pGQH la sobrevivida al reto letal con virus CVS fue del 100%, 50% más en relación al grupo PBS. El análisis de la curva Kaplan-Meier por la prueba Log-rank, mostró diferencias significativas entre el grupo pVaxF1 y el grupo PBS ($P=0.025$) y entre los grupos pGQH y PBS ($P=0.017$).

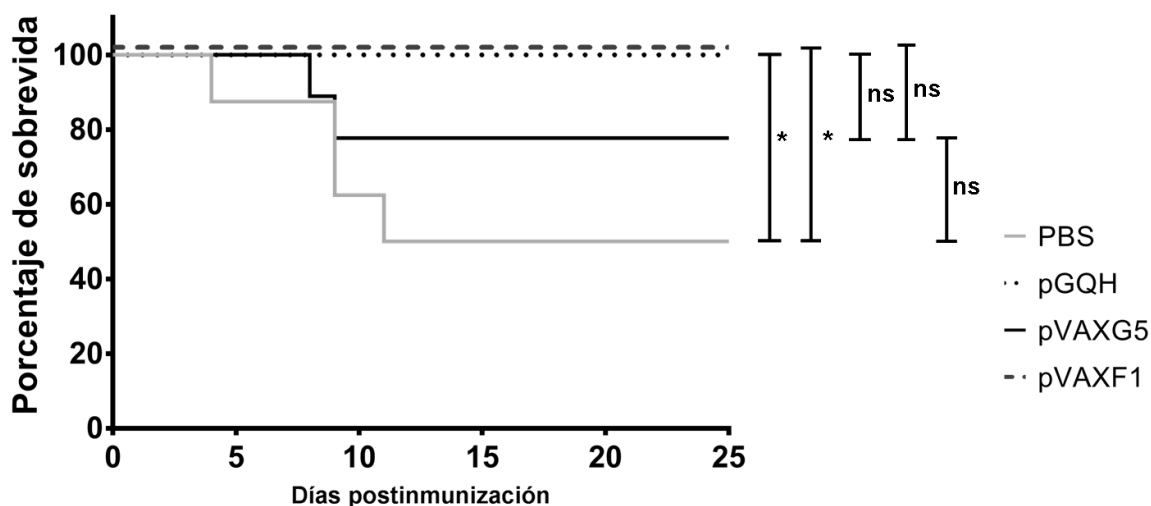


Figura 15.- Gráfica Kaplan-Meier que muestra la sobrevivida de los animales de los grupos: pGQH, G5, F1 y PBS.

Evaluación de signos clínicos.

El efecto de la vacunación sobre los signos clínicos, fue un aspecto interesante que coincidió con los resultados obtenidos en las seroneutralizaciones y la sobrevida. Para poder cuantificar los signos clínicos de la rabia observados, se asignaron valores dependiendo de la gravedad, basándonos en valores reportados por Takayama-Ito y colaboradores (71). Los valores se muestran en la siguiente tabla.

Signos	Puntos
Sin signos	0
Pelo Hirsuto	1
Encorvado	2
Paralítico/sacrificio	3

Tabla 2. Puntaje de los signos clínicos de la rabia, basados en (58) dependiendo de la severidad.

La mayoría de los animales del grupo pVaxF1 no mostraron signos clínicos de rabia, si bien tres mostraron pelo hirsuto en el día 14, en los días subsecuentes los signos desaparecieron y ninguno más mostró signos clínicos de la enfermedad. Basados en los valores de la tabla 2, al día 21, los animales del grupo pVaxF1 obtuvieron una puntuación de cero. El grupo de los animales inoculados con pGQH obtuvo una puntuación final de 0.3, debido a que 4 animales iniciaron con signos de rabia al segundo día pi, tres de ellos con pelo hirsuto se recuperaron en los días 3, 4 y 8, el otro ratón (encorvado) se mantuvo enfermo, con pelo hirsuto hasta el final de la observación. Además, otros 2 ratones enfermaron los días 9 y 17 y se mantuvieron con pelo hirsuto hasta el día 21. Los animales inoculados con pVaxG5 mostraron una puntuación final de 0.66, debido a que dos animales mostraron signos de la enfermedad (uno pelo hirsuto y el otro encorvado) el día 7 y fueron sacrificados los días 8 y 9 respectivamente. Los restantes 7 animales no mostraron signos de la enfermedad. El grupo control PBS mostró signos de rabia desde el día 2 (pelo

hirsuto), uno fue sacrificado en el día 4, dos más se sacrificaron en el día 9 y otro más en el día 11. Los restantes 4 animales mantuvieron con pelo hirsuto hasta el día 21 (puntuación = 2) (Figura 16).

Si bien la sobrevida en todos los grupos vacunados con plásmidos es superior al 80%, la variación en el título de VNAs se ve relacionada con la aparición de los signos clínicos en los animales. Los ratones que muestran bajos niveles de VNAs desarrollan algún signo clínico de la enfermedad, e incluso no sobreviven al reto como en el caso de los dos ratones del grupo pVaxG5.

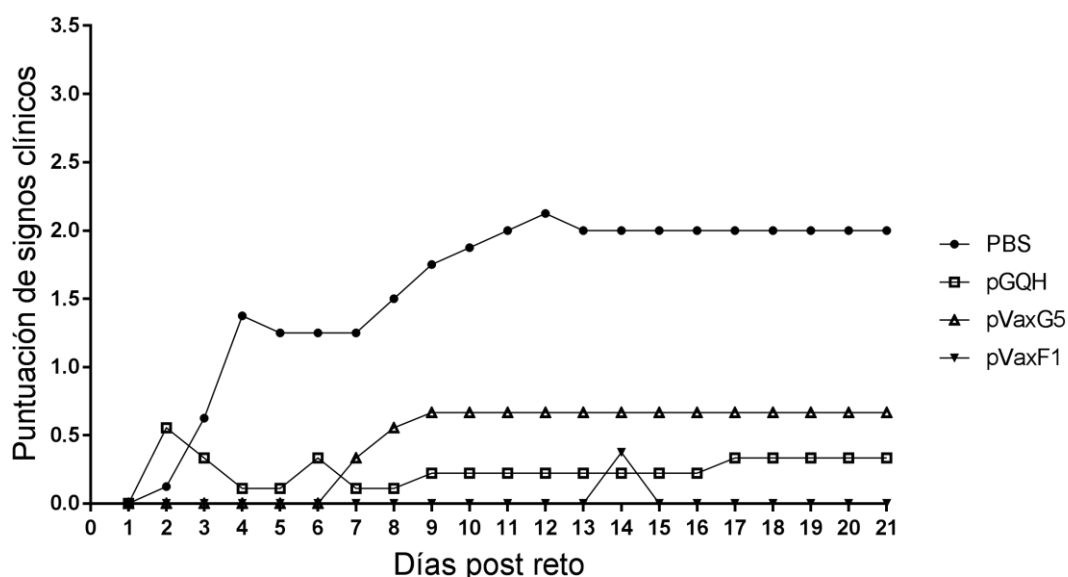


Figura 16. Puntaje de signos clínicos de rabia dependiendo la severidad de la enfermedad.

Proliferación.

Posterior a la estimulación de los esplenocitos con virus RABV, se observó que las células de los animales inmunizados con las diferentes vacunas ADN mostraron una respuesta proliferativa específica contra el virus. La figura 17A muestra una alta proliferación de células B en los animales que recibieron las vacunas pVaxF1 y pGQH, sin embargo,

pVaxF1 muestra diferencias estadísticamente significativas ($P= 0.044$) con el grupo control PBS.

Si bien pVaxG5 mostró una proliferación de células B similar a pVaxF1 y pGQH, el grupo pVaxG5 no mostró proliferación específica de células T CD4⁺ y T CD8⁺. Por otro lado, los grupos pGQH y pVAXF1 mostraron una proliferación similar tanto en células T CD4⁺ (13 y 12% respectivamente) como en células T CD8⁺ (16 y 17% respectivamente). Figura 17B y 17C. Finalmente el grupo control PBS mostró baja o nula proliferación de las poblaciones de células analizadas (células B = 2.3%, células T CD4⁺ = 0.4% y células CD8⁺ = 0%).

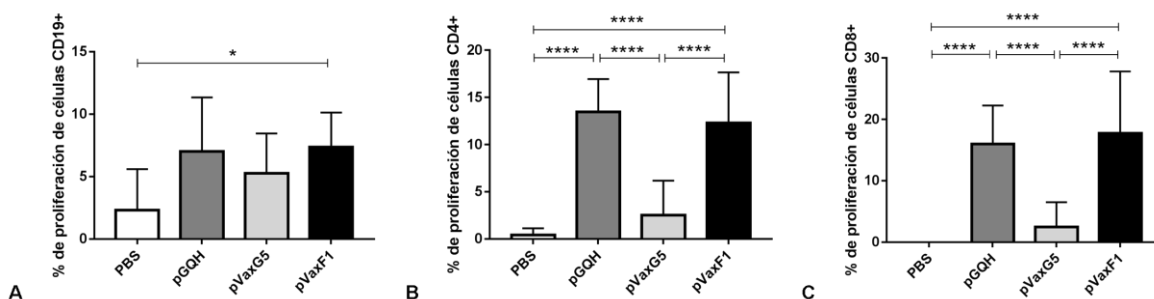


Figura 17. A: proliferación de linfocitos CD19⁺ (células B); B: proliferación de linfocitos CD4⁺ (células T cooperadoras); C: proliferación de linfocitos CD8⁺ (células T citotóxicas) n=6.

VII. DISCUSIÓN

El desarrollo de vacunas a base de ADN para la prevención de enfermedades infecciosas es un campo relativamente nuevo y amplio en nuestro país. El mejoramiento de las vacunas contra la rabia representa un reto debido a la alta efectividad de las vacunas tradicionales, sin embargo, la naturaleza proteica del antígeno presupone un manejo especial que, sumado a los altos costos de producción, las hacen prohibitivas en países donde la rabia es un problema de salud pública. En ese sentido, las vacunas ADN representan una alternativa viable y de bajo costo.

En este trabajo se presentó un modelo de vacunación a base de ADN. Se empleó la secuencia genética que codifica para el epítipo lineal G5 (en este caso se usó la secuencia de la cepa CVS). G5 es un péptido de 38 aminoácidos que forma parte de la glicoproteína del RABV, en forma de polipéptido, ha demostrado inducir VNAs y generar protección parcial (49, 50).

Además, como adyuvante se usó la secuencia genética que codifica para el péptido P28, que es un fragmento de la proteína C3d del complemento (P28-C3d) y es el sitio mínimo de unión de C3d al receptor de complemento 2 (CR2) (44) de células B y células dendríticas foliculares (CDF) principalmente. De manera general, la unión C3d-antígeno al CR2 mejora la respuesta de células B y células dendríticas foliculares (72), promoviendo la retención del antígeno por CDF (73), estimulando la unión al BCR de células B, lo que disminuye el umbral de activación, induce el cambio de isotipo e hipermutación somática, así como la generación de memoria (74). Además, ha sido utilizado como adyuvante molecular en varios modelos de vacunación induciendo altos niveles de anticuerpos protectores (67, 57, 68). Por lo que en este trabajo se construyeron dos vacunas, pVaxG5,

que incluyó el epítipo lineal G5, esto para evaluar el efecto de G5 en la inducción de VNAs y la protección contra el RABV y pVaxF1 que codificó para G5 y C3d-P28 para evaluar el efecto adyuvante de P28 en la mejora de la respuesta en la inducción de VNAs y protección. Además, se comparó con la vacuna pGQH que codifica para la glicoproteína entera, que es capaz de inducir VNAs y protección contra el RABV (46, 42, 43, 44, 45). El epítipo lineal G5, derivado de transfección de ambas vacunas fue reconocido por anticuerpos específicos contra rabia y en el caso P28-C3d derivado de la transfección con pVaxF1, también fue reconocido por anticuerpos específicos contra C3d (Figura 12). Estos datos nos indican que las construcciones moleculares fueron correctas y los péptidos derivados de la transfección emularon a la proteína nativa, lo que nos sugirió que sus propiedades inmunogénicas fueron conservadas.

Con estos datos, se procedió a evaluar la inducción de VNAs y la protección que pudieran conferir las vacunas en un modelo *in vivo* (ratones BALB/c). Como resultado, los sueros de los animales vacunados con pVaxG5 y pVaxF1 mostraron niveles protectores de VNAs contra la rabia (>0.5 UI/mL) desde el día 15. Lo mismo fue observado con la vacuna control pGQH, que codifica para la glicoproteína entera del RABV. En contraste los animales a los que se les administró PBS no mostraron niveles protectores de VNAs (<0.5 UI/mL) (Figura 14).

El título de VNAs de los animales inmunizados con pVaxG5 fue el más alto (5.3 UI/mL ± 1.4), sin embargo, fue disminuyendo del día 45 al 90, lo anterior se vio reflejado en una protección parcial (sobrevida 27% más que el grupo PBS) y en la presencia de signos clínicos (puntaje de los signos clínicos = 0.66) (Figuras 14, 15 y 16). Por otro lado, se observó una respuesta sostenida de VNAs en los animales que recibieron la vacuna pVaxF1 (> 3 UI/mL) durante todo el periodo de inmunización (90 días). Además, la supervivencia de

los animales de este grupo fue significativamente la más alta (50% $P = 0.025$) con respecto al grupo PBS (Figura 14 y 15). Y los animales inmunizados con pVaxF1, no mostraron signos de la enfermedad (puntaje de signos clínicos = 0) (Figura 16). Lo anterior mostró que la antigenicidad de G5 fue potenciada por el adyuvante C3d-P28.

El papel biológico de proteína C3d como opsonizante de antígenos y estimuladora de células B, CDF y algunas poblaciones de células T (60, 57) ha sido aprovechado para su uso como adyuvante en varios modelos de vacunas contra virus y ha demostrado potenciar la respuesta de células B T dependientes (62, 63, 64, 65). En CDF la presencia de altos niveles de CR2, esencial para la retención del antígeno por largos periodos de tiempo, promueve el mantenimiento de los centros germinales, hipermutación somática y memoria inmunológica de largo plazo en células B (73).

Además se ha reportado una inducción de respuesta inmune mediada por células $CD4^+$ y $CD8^+$ por vacunas ADN contra la rabia basadas en G (75, 76). Debido a que se observó una respuesta sostenida de VNAs en el grupo inmunizado con pVaxF1, no se descartó una respuesta T dependiente, considerando que las responsables de proveer ayuda a las células B en los centros germinales son las células T foliculares (77) se evaluó la proliferación de células T del bazo en los ratones vacunados. Los animales vacunados con pVaxF1 mostraron proliferación de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ significativamente más alta que la exhibida por los animales vacunados con pVaxG5. Aunque la vacunación con pVaxG5 provee estímulo inicial para la proliferación de células B $CD19^+$ necesarias para la producción de anticuerpos, esta no fue suficiente para promover la proliferación de células T específicas para antígenos de rabia. Las diferencias en la proliferación de células T $CD4^+$ y $CD8^+$ de los animales vacunados con pVaxG5 y pVaxF1 puede ser explicada por la influencia de factores relacionados a la vida media del antígeno y la persistencia del epítipo

recombinante G5. De hecho, es necesaria una exposición prolongada del antígeno para una expansión clonal óptima y el desarrollo de las funciones efectoras de las células T CD4⁺ y CD8⁺ (78, 79). Para determinar si los péptidos recombinantes G5-C3d-P28 son retenidos por las CDFs se requieren trabajos adicionales.

Las células T CD8⁺ están involucradas en la eliminación de células infectadas por virus (80). Recientemente Lou y colaboradores (81) desarrollaron una vacuna contra la rabia la cual incluye IL6 como adyuvante molecular, resultando en el mejoramiento de la producción de VNAs y una rápida eliminación del RABV de las células hospederas mediante células T CD8⁺. De acuerdo con esto, nuestros resultados en la respuesta proliferativa de células T CD8⁺ en el grupo pVaxF1 sugiere que esta subpoblación celular está asociada con la mejora en los signos clínicos en los animales.

Como se ha observado en otros trabajos (82) la presencia de adyuvantes moleculares como Myd88 en vacunas ADN contra la rabia, mejora la protección reflejada en la sobrevivencia de los animales, debido a su efecto en diversas vías que inducen la formación de citocinas pro inflamatorias. A diferencia de Myd88, el efecto de C3d-P28 está enfocado a estimular específicamente la inducción de células plasmáticas y la retención del antígeno en centros germinales por CDFs.

La variabilidad intra-grupo observada en los títulos de VNAs, sugiere que la transfección *in vivo* no fue homogénea. A este respecto, un factor que puede reducir la eficacia de la entrega de ADN por la vía intramuscular, es que la mayoría de las células que toman el ADN son células musculares que por sí solas no son capaces de iniciar una respuesta en células T (83), además de que hay bajo número de células presentadoras de antígeno dentro de este tejido (84, 55). Sin embargo, el título de VNAs en los grupos pVaxG5 y pVaxF1 excedió las 0.5 UI/mL en todos los casos.

VIII. CONCLUSIÓN

- Se demostró que el epítipo lineal G5 es un candidato potencial para el desarrollo de vacunas ADN contra la rabia, ya que la vacuna pVaxG5 indujo niveles protectores (>0.5 UI/mL) de VNAs y protección parcial (27%) contra el reto.
- Con la adición de la secuencia genética de C3d-P28 como adyuvante molecular al epítipo lineal G5 (vacuna pVaxF1), se mejoró la respuesta inmune de anticuerpos, ya que la producción de VNAs se sostuvo durante más tiempo y la sobrevivencia aumentó al 50%, (similar a la obtenida usando la vacuna pGQH que tiene la secuencia completa de la glicoproteína).
- Si bien, se detectó proliferación antígeno específica de células T $CD4^+ CD8^+$ en los bazo de los animales vacunados con pGQH y pVaxF1, sólo en los bazo de los animales inoculados con pVaxF1 se observó proliferación de células B.
- En comparación con los otros grupos, los ratones vacunados con pVaxF1 no mostraron signos clínicos de la enfermedad después del reto letal con $22DL_{50\%}$ del virus de desafío CVS al día 90.
- Finalmente, el uso del epítipo lineal G5 fusionado al adyuvante C3d-P28 puede ser una alternativa en el desarrollo de una nueva generación de vacunas ADN contra la rabia.

IX. LITERATURA CITADA

- 1 McColl KA, Tordo N, Aguilar Setién AA. Bat lyssavirus infections. *Rev Sci Tech.* 2000 Apr;19(1):177-96.
- 2 Banyard AC, Evans JS, Luo TR, Fooks AR. Lyssaviruses and bats: emergence and zoonotic threat. *Viruses.* 2014 Aug 4;6(8):2974-90. doi: 10.3390/v6082974.
- 3 Banyard AC, Fooks AR. The impact of novel lyssavirus discovery. *Micro Aust* 2017;38:18–21
- 4 Badrane H, Tordo N. Host switching in Lyssavirus history from the Chiroptera to the Carnivora orders. *J Virol.* 2001 Sep;75(17):8096-104.
- 5 Cai K, Feng JN, Wang Q, Li T, Shi J, Hou XJ, Gao X, Liu H, Tu W, Xiao L and H. Wang. 2010. Fine mapping and interaction analysis of a linear rabies virus neutralizing epitope. *Microbes and Infection.* 12:948-55.
- 6 Bauer A, Nolden T, Schröter J, Römer-Oberdörfer A, Gluska S, Perlson E, Finke S. Anterograde glycoprotein-dependent transport of newly generated rabies virus in dorsal root ganglion neurons. *J Virol.* 2014 Dec;88(24):14172-83. doi: 10.1128/JVI.02254-14.
- 7 Guo Y, Duan M, Wang X, Gao J, Guan Z, Zhang M. Early events in rabies virus infection-Attachment, entry, and intracellular trafficking. *Virus Res.* 2019 Apr 2;263:217-225. doi: 10.1016/j.virusres.2019.02.006.
- 8 Belot L, Albertini A, Gaudin Y. Structural and cellular biology of rhabdovirus entry. *Adv Virus Res.* 2019;104:147-183. doi: 10.1016/bs.aivir.2019.05.003.
- 9 Prehaud C., Coulon P., Lafay F., Thiers C. and A. Flamand. 1988. Antigenic site II of the rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *J Virol* 62, 1–7.
- 10 Benmansour A, Leblois H, Coulon P, Tuffereau C, Gaudin Y, Flamand A, Lafay F. 1991. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J Virol.* 65(8):4198-203.
- 11 Johnson N, Mansfield KL, Fooks AR. Canine vaccine recipients recognize an immunodominant region of the rabies virus glycoprotein. *J Gen Virol.* 2002 Nov;83(Pt 11):2663-9.

- 12 Lafon M. 2016 Rabies en *Neurotropic Viral Infections* Springer International Publishing Switzerland C.S. Reiss (ed.). DOI 10.1007/978-3-319-33133-1_4
- 13 WHO 2018 <http://www.who.int/immunization/diseases/rabies/en/>
- 14 OIE. 2019 <https://www.oie.int/en/animal-health-in-the-world/rabies-portal/about-rabies/>
- 15 CDC. 2019 <https://www.cdc.gov/rabies/index.html>
- 16 Yan X, Mohankumar PS, Dietzschold B, Schnell MJ, Fu ZF. The rabies virus glycoprotein determines the distribution of different rabies virus strains in the brain. *J Neurovirol.* 2002 Aug;8(4):345-52.
- 17 Fooks AR, Banyard AC, Horton DL, Johnson N, McElhinney LM, Jackson AC. Current status of rabies and prospects for elimination. *Lancet.* 2014 Oct 11;384(9951):1389-99. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62707-5.
- 18 WHO. 2017. <http://www.who.int/rabies/epidemiology/en/> Available in: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/rabies>
- 19 CENAPRECE. 2018.
<http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/zoonosis/descargas/pdf/CRH18.pdf>
- 20 Vargas G.R. y L.J. Cardenas. 1996. Epidemiología de la Rabia: Situación actual en México. *Ciencia Veterinaria.* 7: 331-360.
- 21 Loza R.E. y S.A. Aguilar. 1998. Estudio de la variabilidad molecular del virus de rabia en México. *Ciencia Veterinaria.* 8: 51-84.
- 22 SAGARPA 2011. CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA RABIA PARALÍTICA BOVINA.
<http://www.senasica.gob.mx/default.asp?id=804>
- 23 Pastoret P.P., Brochier B., Aguilar-Setién A. and J. Blancou. 1997. Vaccination against rabies. In *Veterinary Vaccinology.* Pastoret P.P., Blancou J., Vannier P. and C. Verschueren. Eds. ELSEVIER SCIENCE. Netherland. 616-628 pp.
- 24 Kaur M., Saxena A., Rai A. and R. Bhatnagar. 2010. Rabies DNA vaccine encoding lysosome-targeted glycoprotein supplemented with Emulsigen-D confers complete protection in preexposure and postexposure studies in BALB/c mice. *The FASEB Journal* 24(1):173-83.
- 25 Wiktor, T. J., Macfarlan R. I., Reagan K. J., Dietzschold B., Curtis P. J., Wunner W. H., Kieny M.-P., Lathe R., Lecocq J.-P., Mackett M., Moss B. and H. Koprowski. 1984. Protection from rabies by a

vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. Proc. Natl. Acad. Sci. 81:7194-7198.

26 Müller TF, Schröder R, Wysocki P, Mettenleiter TC, Freuling CM. 2015. Spatio-temporal Use of Oral Rabies Vaccines in Fox Rabies Elimination Programmes in Europe. PLoS Negl Trop Dis. Aug 17;9(8):e0003953. doi: 10.1371/journal.pntd.0003953.

27 Pastoret PP, Kappeler A, Aubert M. 2004. European rabies control and its history. In: King AA, Fooks AR, Aubert M, Wandeler AI, editors. Historical perspective of rabies in Europe and the Mediterranean Basin. Paris: OIE;. p. 337–50.

28 Freuling C, Hampson K, Selhorst T, Schröder R, Meslin FX, Mettenleiter TC. 2013. The elimination of fox rabies from Europe: determinants of success and lessons for the future. Phil Trans R Soc B.; 368(1623).

29 Mendoza EJ, Warner B, Kobinger G, Ogden NH, Safronetz D. Baited vaccines: A strategy to mitigate rodent-borne viral zoonoses in humans. Zoonoses Public Health. 2018 Jun 21. doi: 10.1111/zph.12487.

30 Tang D.C., De Vit M., and S.A. Johnston. 1992 Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. Nature. 356:152-154.

31 Wolff J.A., Malone R.W., Williams P., Chong W., Acsadi G., Jani A. and L.P. Felgner. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. Science 247. 1465-1468.

32 Robinson H.L., Hunt L.A. and R.G. Webster. 1993. Protection against a lethal influenza virus Challenger by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. Vaccine. 11. 957-960.

33 Ulmer J.B., Donnelly J.J., Parker S.E., Rhodes G.H., Felgner P.L., Dwarki V.J., Gromkowski S.H., Deck R.R., De Witt D.M., Friedman A., Hawe L.A., Leander K.R., Martínez D., Perry H.C., Shiver J.W., Montgomery D.C. and M.A. Liu. 1993. Heterologous protection against influenza by injection of DNA encoding a viral proteína. Science. 259. 1745-1749.

34 Tüting T., Austin J., Storkus W.J., and J.D. Falo Jr. 1999. The Immunology of DNA vaccines. In: DNA Vaccines: Methods and Protocols (ed. Lowrie D.B. and Whalen R.G. Human Press Inc.). Vol. 29. p. 37-63. Totowa, N.J.

- 35 Cichutek K. 2000. DNA vaccines: Development, Standardization and Regulation. *Intervirology*. 43:331-338.
- 36 Dumonteil E. 2000. Vacunas de DNA: el presente y el futuro. *Rev. Biomed.* 11 (Supl. 1) S7-S12.
- 37 Gurunathan S., Klinman D.M., and R.A. Seder. 2000. DNA Vaccines: Immunology, application and Optimization. *Annu. Rev. Immunol.* 18:927-974.
- 38 Garmory H.S., Brown K.A., and R.W. Titball. 2003. DNA vaccines: Improving expression of antigens. *Genetic vaccines and therapy*. 1.2.
- 39 Perrin P. Jacob Y. and Tordo N. 2000a. DNA-Based Immunization against Lyssaviruses. *Intervirology*. 43:302-311
- 40 Lodmell D.L., Ray N.B., Parnell M.J., Ewalt L.C., Hanlon C.A., Shaddock J.H., Sanderlin D.S. and C.E. Rupprecht. 1998. DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus. *Nad. Med.* 4(8):949-52.
- 41 Perrin P. Jacob Y., Aguilar-Setién A., Loza-Rubio E., Jallet C., Desmazières E., Aubert M., Cliquet F. and N. Tordo 2000b. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine* 18:479-486.
- 42 Tesoro-Cruz E., Hernández-González R., Alonso-Morales R and A. Aguilar-Setién. 2006. Rabies DNA vaccination by the intranasal route in dogs. *Dev. Biol.* 125: 221-231
- 43 Tesoro Cruz E., Feria Romero I.A., Lopez Mendoza J.G., Orozco Suárez S., Hernández González R., Blanco Favela F, Pérez Torres A. and A. Aguilar Setién. 2008. Efficient post-exposure prophylaxis against rabies by applying a four-dose DNA vaccine intranasally. *Vaccine*. 26(52): 6936-6944.
- 44 Tesoro-Cruz E., Calderón-Rodríguez R., Hernández-González R., Blanco-Favéla F. and A. Aguilar-Setién. 2008. Intradermal DNA vaccination in ear pinnae is an efficient route to protect cats against rabies virus. *Vet. Res.* 39:16
- 45 Aguilar-Setién A., Tesoro Cruz E., Salas Rojas M., Alonso Morales R. and F. Blanco Favela. 2008. Las vacunas génicas (ADN): ¿pueden sustituir a las convencionales para el control de la rabia?. *Bioquímica*. 33(4): 147-154.

46 Salas-Rojas M. 2005. Respuesta inmune de una vacuna génica contra el virus de la rabia empleando *Salmonella typhimurium* SL3261 como vector y con la ayuda de pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae*. Tesis de Maestría. Ciencias Biológicas. UNAM. 82 pp.

47 Dietzschold, B., Wunner, W. H., Wiktor, T. J., Lopes, A. D., Lafon, M., Smith, C. L. and H. Koprowski,. 1983. Characterization of an antigenic determinant of the glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. Proc Natl Acad Sci 80, 70–74.

48 Seif, I., Coulon, P., Rollin, P. E. and A. Flamand. 1985. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. J Virol 53, 926–934.

49 Dietzschold B., Gore M., Marchadier D., Niu H.-S., Bunschoten H.M., Otvos L., Wunner W.H., Ertl J.C.H., Osterhaus A.D.M. and H. Koprowski. 1990. Structural and immunological characterization of a linear virus neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. J Virol. 64: 3804-9.

50 Ni, Y., Tominaga, Y., Honda, Y., Morimoto, K., Sakamoto, S. and A. Kawai. 1995. Mapping and characterization of a sequential epitope on the rabies virus glycoprotein which is recognized by a neutralizing monoclonal antibody, RG719. Microbiol Immunol 39, 693–702.

51 Bunschoten H, Gore M, Claassen IJ, Uytdehaag FG, Dietzschold B, Wunner WH, Osterhaus AD. 1989. Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein. J Gen Virol;70:291-8.

52 Van der Heijden RW, Langedijk JP, Groen J, UytdeHaag FG, Meloen RH, Osterhaus AD. Structural and functional studies on a unique linear neutralizing antigenic site (G5) of the rabies virus glycoprotein. J Gen Virol 1993;74:1539-45.

53 Niederhäuser S, Bruegger D, Zahno ML, Vogt HR, Peterhans E, Zanoni R, Bertonni G. A synthetic peptide encompassing the G5 antigenic region of the rabies virus induces high avidity but poorly neutralizing antibody in immunized animals. Vaccine 2008;26:6749-53. doi: 10.1016/j.vaccine.2008.10.020.

54 Zhao XL, Yin J, Chen WQ, Jiang M, Yang G, Yang ZH. 2008. Generation and characterization of human monoclonal antibodies to G5, a linear neutralization epitope on glycoprotein of rabies virus, by phage display technology. Microbiol Immunol ;52:89-93. doi: 10.1111/j.1348-0421.2008.00016.x.

- 55 Li L, Petrovsky N. 2016. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines*;15:313-29. doi: 10.1586/14760584.2016.1124762.
- 56 Bower J.F., Sanders K.L. and T.M. Ross. 2005. C3d enhances immune responses using low doses of DNA expressing the HIV-1 envelope from codon-optimized gene sequences. *Curr HIV Res.* (2):191-8.
- 57 Bower J.F. and T.M. Ross. 2006. A minimum CR2 binding domain of C3d enhances immunity following vaccination. *Adv Exp Med Biol.* 586:249-64.
- 58 Toapanta F.R., DeAlmeida D.R., Dunn M.D. and T.M. Ross. 2010. C3d adjuvant activity is reduced by altering residues involved in the electronegative binding of C3d to CR2. *Immunol Lett.* 129(1):32-8.
- 59 Carroll M.C. 2000. The role of complement in B cell activation and tolerance. *Adv Immunol.* 74:61-88
- 60 Dempsey P.W., Allison M.E., Akkaraju S., Goodnow C.C., and D.T. Fearon. 1996 C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity, *Science.* 271. 348-350.
- 61 Test S.T., Mitsuyoshi J., Connolly C.C., and A.H. Lucas. 2001. Increased immunogenicity and induction of class switching by conjugation of complement C3d to pneumococcal serotype 14 capsular polysaccharides. *Infect. Immun.* 69. 3031– 3040.
- 62 Ross T.M., Xu Y., Bright R.A., and H.L. Robinson. 2000. C3d enhancement of antibodies to hemagglutinin accelerates protection against influenza virus Challenger. *Nat. Immunol.* 1. 127– 131.
- 63 Mitchell J.A., Green T.D., Bright R.A., and T.M. Ross. 2003. Induction of heterosubtypic immunity to influenza A virus using a DNA vaccine expressing hemagglutinin-C3d fusion proteins. *Vaccine.* 21. 902– 914.
- 64 Ross T.M., Xu Y., Green T.D., Montefiori D.C., and H.L. Robinson. 2001. Enhanced avidity maturation of antibody to human immunodeficiency virus envelope: DNA vaccination with gp120-C3d fusion proteins, *AIDS Res. Hum. Retrovir.* 17. 829– 835.
- 65 Green T.D., Newton B.R., Rota P.A., Xu Y., Robinson H.L. and T.M. Ross. 2002. C3d enhancement of neutralizing antibodies to measles hemagglutinin. *Vaccine.* 20. 242– 248.
- 66 Servis C. and J.D. Lambris. 1989. C3 synthetic peptides support growth of human CR2-positive lymphoblastoid B cells. *J Immunol* 142. 2207-2212.

67 Li-Xin W., Wei X., Qing-Dong G., Yi-Wei C., Ying W. and X. Si-Dong. 2004. Contribution of C3d-P28 repeats to enhancement of immune responses against HBV-preS2/S induced by gene immunization. *World Journal of Gastroenterology*. 10. 2072-2077.

68 Zhanga D., Xia Q., Wu J., Liu D., Wang X. and Z. Niu. 2011. Construction and immunogenicity of DNA vaccines encoding fusion protein of murine complement C3d-p28 and GP5 gene of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Vaccine* 29. 629–635.

69 Sambrook J. and D.W. Russell. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3rd ed. CSHL. PRESS. New York.

70 Bourhy H. and P. Sureau. 1996. *Methodes de laboratoire pour le diagnostic de la rage*. Comisión des laboratoires de reference et d'expertise de L'Institut Pasteur. Paris, France.

71 Takayama-Ito M, Lim CK, Nakamichi K, Kakiuchi S, Horiya M, Posadas-Herrera G, Kurane I, Saijo M. Reduction of animal suffering in rabies vaccine potency testing by introduction of humane endpoints. *Biologicals* 2016; pii: S1045-1056(16)30167-1. doi: 10.1016/j.biologicals.2016.12.007.

72 Rickert RC. Regulation of B lymphocyte activation by complement C3 and the B cell coreceptor complex. *Curr Opin Immunol*. 2005 Jun;17(3):237-43. Review. PubMed PMID: 15886112.

73 Heesters BA, Myers RC, Carroll MC. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol* 2014;14:495-504. doi: 10.1038/nri3689.

74 De Groot AS, Ross TM, Levitz L, Messitt TJ, Tassone R, Boyle CM, Vincelli AJ, Moise L, Martin W, Knopf PM. 2015. C3d adjuvant effects are mediated through the activation of C3d-specific autoreactive T cells. *Immunol Cell Biol*. 93(2):189-97. doi: 10.1038/icb.2014.89. Epub 2014 Nov 11. PubMed PMID: 25385064; PubMed Central PMCID: PMC4323994.

75 Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner WH, Cheng J, Ertl HC. 1994. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology*;199:132-40.

76 Johnson N, Cunningham AF, Fooks AR. The immune response to rabies virus infection and vaccination. *Vaccine* 2010;28:3896-901. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.03.039.

77 Crotty S. 2014. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 2014;41:529-42. doi: 10.1016/j.immuni..10.004.

78 Curtsinger JM, Johnson CM, Mescher MF. 2003. CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation, and signal 3 cytokine. *J Immunol*;171:5165-71.

79 Tam HH, Melo MB, Kang M, Pelet JM, Ruda VM, Foley MH, Hu JK, Kumari S, Crampton J, Baldeon AD, Sanders RW, Moore JP, Crotty S, Langer R, Anderson DG, Chakraborty AK, Irvine DJ. Sustained antigen availability during germinal center initiation enhances antibody responses to vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113:E6639-E6648.

80 Zhang N, Bevan MJ. 2011. CD8 (+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*;35:161-8. doi: 10.1016/j.immuni.2011.07.010.

81 Luo J, Zhang B, Wu Y, Tian Q, Zhao J, Lyu Z, Zhang Q, Mei M, Luo Y, Guo X. Expression of interleukin-6 by a recombinant rabies virus enhances its immunogenicity as a potential vaccine. *Vaccine* 2017;35:938-44. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.12.069.

82 Ullas PT, Desai A, Madhusudana SN. Immunogenicity and efficacy of a plasmid DNA rabies vaccine incorporating Myd88 as a genetic adjuvant. *Clin Exp Vaccine Res* 2014;3:202-11. doi: 10.7774/cevr.2014.3.2.202.

83 Akbari O, Panjwani N, Garcia S, Tascon R, Lowrie D, Stockinger B. 1999. DNA vaccination: transfection and activation of dendritic cells as key events for immunity. *J Exp Med.* 4;189(1):169-78.

84 Kutzler MA, Weiner DB. 2008. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* ;9:776-88. doi: 10.1038/nrg2432.

X. APENDICE (artículo requisito para la obtención de grado)

Vaccine 35 (2017) 252–258



Contents lists available at ScienceDirect

Vaccine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vaccine



Addition of C3d-P28 adjuvant to a rabies DNA vaccine encoding the G5 linear epitope enhances the humoral immune response and confers protection



Guillermo Galvez-Romero^{a,b}, Mónica Salas-Rojas^c, Ericka N. Pompa-Mera^c, Karina Chávez-Rueda^d, Álvaro Aguilar-Setién^{a,*}

^a Unidad de Investigación Médica en Inmunología, UMAE Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional "Siglo XXI", Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, Mexico

^b Posgrado en Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, Mexico

^c Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 April 2017

Received in revised form 8 November 2017

Accepted 12 November 2017

Available online 27 November 2017

Keywords:

DNA vaccine

Rabies virus

Linear epitope G5

Adjuvant C3d-P28

ABSTRACT

Rabies DNA vaccines based on full-length glycoprotein (G) induce virus neutralizing antibody (VNA) responses and protect against the virus challenge. Although conformational epitopes of G are the main target of VNAs, some studies have shown that a polypeptide linear epitope G5 is also able to induce VNAs. However, a G5 DNA vaccine has not been explored. While multiple doses of DNA vaccines are required in order to confer a protective immune response, this could be overcome by the inclusion of C3d-P28, a molecular adjuvant is known to improve the antibody response in several anti-viral vaccine models. To induce and enhance the immune response against rabies in mice, we evaluated two DNA vaccines based on the linear epitope G5 of Rabies Virus (RABV) glycoprotein (pVaxG5 vaccine) and another vaccine consisting of G5 fused to the molecular adjuvant C3d-P28 (pVaxF1 vaccine). VNA responses were measured in mice immunized with both vaccines. The VNA levels from the group immunized with pVaxG5 decreased gradually, while those from the group vaccinated with pVaxF1 remained high throughout the experimental study. After challenge with 22 LD₅₀ of the Challenge Virus Strain (CVS), the survival rate of mice immunized with pVaxG5 and pVaxF1 was increased by 27% and 50% respectively, in comparison to the PBS group. Furthermore, the *in vitro* proliferation of anti-rabies specific spleen CD4⁺ and CD8⁺ T cells from mice immunized with pVaxF1 was observed. Collectively, these results suggest that the linear G5 epitope is a potential candidate vaccine. Furthermore, the addition of a C3d-P28 adjuvant contributed to enhanced protection, the sustained production of VNAs, and a specific T-cell proliferative response.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Rabies is a global zoonotic disease resulting from infection with a single-stranded RNA virus of the genus *Lyssavirus* that causes acute, progressive, and fatal encephalomyelitis in mammals. Although rabies is a vaccine-preventable disease, the World Health Organization reports that there are 59,000–61,000 human deaths resulting from rabies every year. These occur mainly in Africa and Asia regions [1–3].

Human pre- and post-exposure treatments and animal vaccinations are the main methods for rabies prevention and control [4,5].

A considerable number of rabies vaccines have been produced since the early 19th century [6–8]. The classical rabies vaccines (live-attenuated or inactivated virus) are required in high and multiple doses [9,10]. The potential reversion to virulence of live attenuated vaccines remains a huge concern [4]. At the same time, recombinant or subunit vaccines, used in wildlife vaccination, represent an advance in stability [11–14]. Nevertheless, production of these vaccines is expensive, making them unaffordable in developing countries where they are needed [15].

Alternatively, plasmid DNA vaccines avoid the use of pathogenic viruses during their manufacture, and they are stable at room temperature. This reduces their cost and makes them affordable in developing countries. Furthermore, it is possible to modify and/or vary the number of target genes or to express chimeric genes in their design [16].

* Corresponding author.

E-mail address: estiviro@hotmail.com (Á. Aguilar-Setién).

<https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.047>
0264-410X/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Rabies DNA vaccines based on the complete glycoprotein (G) sequence [17–19] induce virus neutralizing antibodies (VNAs) and protect against viral challenge in pre- [20–23] and post-exposure animal models [24,25]. Since most VNAs bind to conformational epitopes of G [26], the integrity and proper conformation of the G epitopes are critical to induce a protective (VNA > 0.5 IU/ml) immune response [27]. Furthermore, G contains linear epitopes, including the linear epitope G5 (amino acids 244–281). This antigen does not depend on the native conformation of G to generate neutralizing antibodies [28]. In addition, the analysis of its secondary structure revealed a helical section with the same epitope characteristics in T cells, adjacent to the central sequence of the G5 neutralizing epitope [29]. G5 is conserved in most rabies fixed (CVS, SAD, ERA, FLURY, and PV) and street strains and is capable of inducing VNAs and partial protection when used as a polypeptide [27,28,30,31]. However, a G5 DNA vaccine has not been explored.

Although DNA vaccines require high and multiple doses to induce a protective immune response, they can be improved by the inclusion of a molecular adjuvant [16]. In this regard, the fusion of nucleotide sequences of C3d (complement component) or its minimum-binding domain C3d-P28 to epitopes in DNA vaccines enhances the antibody response by directly interacting with complement receptor 2 (CR2/CD21) on B cells [32,33]. For these reasons, the purpose of this article was to develop and evaluate two rabies DNA vaccines which are based on the linear epitope G5 of Rabies Virus (RABV) glycoprotein (pVaxG5 vaccine) and G5 fused to the molecular adjuvant C3d-P28 (pVaxF1 vaccine).

In this study, the humoral and cellular immune responses induced by the pVaxG5 and pVaxF1 vaccines were evaluated in a mouse model. The vaccine pVaxF1 induced a sustained VNA response characterized by titers higher than 3 IU/ml after two immunizations. In addition, the survival rate observed in the pVaxF1 group was improved by 50% relative to that observed in the PBS group. Importantly, spleen T-cells from vaccinated mice with pVaxF1 exhibited the highest levels of anti-rabies specific proliferation. Collectively, these results demonstrate that the addition of C3d-P28 adjuvant to linear epitope G5 enhanced protection, inducing a sustained production of VNAs and a specific T-cell proliferative response in mice.

2. Materials and methods

2.1. Cell, virus and animals

BHK-21 cells were maintained in Eagle's Minimal Essential Medium (MEM) (Invitro) supplemented with 8% fetal bovine serum (SFB) at 37 °C. The Pasteur Virus (PV) strain was propagated for the neutralization assay in BHK-21 cells. The challenge virus strain (CVS) was propagated in suckling BALB/c mice. For the immunization test, three-week-old female BALB/c mice were maintained in specific pathogen-free environmental conditions with water and food *ad libitum*. All animal care and experiments were carried out in accordance with Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 (national guidelines) and all protocols were approved by the IMSS Local Research and Bioethics Committee (No. 2012-3603-85).

2.2. Genetic engineering and strains

To generate the DNA vaccines that encode linear epitope G5 alone or fused to the C3d-P28 adjuvant, the pVAX1⁺ plasmid (Invitrogen-Life Technologies[®]; Palo Alto, California, USA) was used as an expression vector. An overlapping extension PCR strategy was used to generate synthetic genes. Briefly, to generate the amplicons G5A (the signal peptide and Kozak site) and G5B (the

G5 epitope), the primer pairs G5A/Fw - G5B/Rv and G5C/Fw - G5D/Rv were used, respectively. Subsequently, PCR was performed using amplicons G5A and G5B as templates and primers G5A/Fw and G5D/Rv to generate G5 with adapters XhoI and HindIII. The G5 was restricted and cloned into plasmid pVAX1⁺ plasmid, to generate plasmid pVaxG5.

To generate synthetic murine C3d-P28, a similar PCR strategy with overlapping primers P28T/Fw and P28T/Rv was used. The resulting amplicon C was used as a template in a second PCR to include adapters HindIII and XbaI (amplicon D). Finally, amplicon D and amplicon G5 were digested with the HindIII enzyme and then ligated with T4 ligase (New England Biolabs[®]). The ligation product was amplified by PCR, restricted and cloned into plasmid pVAX1⁺ to generate plasmid pVaxF1.

Escherichia coli DH5 α strain (SupE44 ∇ lac 169 α 80 lac Z ∇ M 15 hsd R17 recA1 endA1 gyrA 96thi-1re1A1; GIBCO[®]) was transformed with the pVaxG5 and pVaxF1 constructs. All standard molecular biological techniques and cloning methods were performed as describe by Sambrook and Russell [34]. All recombinant plasmids were verified by PCR and confirmed by Sanger sequencing using the BigDye[®] Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the pVaxG5P28/Fw and pVaxG5P28/Rv primers. Sequencing reactions were performed in an ABI Prism 310 genetic analyzer (Applied Biosystems). The oligonucleotides used in this study are presented in [Supplementary Table 1](#).

2.3. Vaccine production

Plasmid vaccines (pVaxG5 and pVaxF1) were purified from cultures of *E. coli* using an EndoFree[®] Plasmid Mega kit (QIAGEN[®]). Electrophoresis in 1% agarose and spectrophotometric analysis were performed to verify the integrity, purity and concentration of plasmid. The plasmids vaccines were stored at -70 °C until use. The control pGQH plasmid (encoding a whole RABV glycoprotein) was produced as previously reported [22].

2.4. Transfection and protein detection

For protein expression, BHK-21 cells were transfected with pVaxG5, pVaxF1 and pGQH using the Lipofectamine[®] 2000 Transfection Reagent (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. After 48 h, the recombinant proteins were recovered from the lysed cells and supernatants.

To detect the recombinant proteins, a dot-blot test was performed. Twenty micrograms of total proteins were dropped and dried directly onto a nitrocellulose membrane 0.45 μ m (BIO-RAD). Membranes were blocked with TTBS buffer (Tris 50 mM, NaCl 0.5 M and Tween-20 0.05%) plus 5% lactose-free milk and were washed for 10 min with TTBS buffer (washing buffer). Immunodetection was performed with anti-rabies-human immunoglobulin (Berirab[®] P, CSL Behring) at a dilution of 1:100 or anti-C3d-Goat antibody (R&D Systems) at a dilution 1:1500 as primary antibodies. After washing, membranes were incubated with HRP-Goat anti-human IgG (ZyMax[™] ZYMED[®]) at a 1:5000 dilution or HRP-Rabbit anti-goat IgG (ZyMax[™] ZYMED[®]) at a 1:3000 dilution. All immune reactions were incubated at 37 °C with shaking and revealed with 0.03% diaminobenzidine (DAB) and 35% H₂O₂.

2.5. Immunization and challenge experiments in mice

A single immunization and challenge experiment was performed. For immunization, 2 doses (day 1 and booster on day 30) of 20 μ g of DNA diluted in 50 μ l of PBS were inoculated by an intramuscular route (IM). Three groups of mice were immunized with

plasmids pVaxG5 (n = 9), pVaxF1 (n = 10), and pGQH (n = 9). A sham-immunized group with PBS (n = 8) was also used. Sample sera were collected on 15, 45, and 90 days after the first immunization. On day 91, all groups were challenged by an intra-cerebral route (ic) with 22 LD50 of CVS (Fig. 2A). Mice were observed for 21 days post-infection (pi) with the daily recording of their survival and the clinical signs of each group. Any deaths occurring in the first three days after challenge were treated as virus non-specific.

2.6. Rapid fluorescence focus inhibition test (RFFIT)

To determine the VNA titer against RABV, serum that was heat-inactivated at 56 °C for 30 min was used in the standard rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) [35]. Anti-rabies fluorescent conjugates (monoclonal anti-nucleocapsid FUJIREBIO™) were used to demonstrate RABV infection in a UV light inverted microscope (Olympus IMT-2). Antibody titers were expressed in International Units per milliliter (IU/ml) using serum at a 10 IU/ml concentration as a reference. VNA levels above 0.5 IU/ml are considered protectors [35].

2.7. Evaluation of clinical signs

After challenge, animals were observed daily for 21 days to detect any signs of rabies [35]. The disease severity was scored following a modified classification of Takayama-Ito [36]: no signs of rabies (Score 0), ruffled fur (Score 1), hunched-back posture (Score 2), and early signs of paralysis (Score 3).

2.8. Cell proliferation assays

Spleens from two vaccinated mice of each group were obtained 116 days after boosting. Splenocytes were labeled with CFSE (Carboxyfluorescein Diacetate Succinimidyl Ester) and cultured at 5×10^5 cells per well in 96-well plates (Nunc™). Splenocytes were stimulated in triplicate either with a VERORAB rabies vaccine (0.25 IU/well) or medium alone at 37 °C under 5% CO₂. After 96 h of incubation, cells were harvested, washed with PBS, and stained with Viability™ fixable dyes viable marker (Miltenyi Biotec). Cells were fixed with 2% paraformaldehyde and were stained with a surface antibody cocktail, including antiCD19-PE (clone: 6D5), antiCD4-PE-Cy7 (clone: REA604) and antiCD3-PE-Cy5 (clone: REA641) mouse antibodies (Miltenyi Biotec). Finally, cells were suspended in PBS for their immediate acquisition on a MacsQuant Analyzer 10 flow cytometer. Data were analyzed using FlowJo software v.10.

2.9. Statistical analysis

For the seroneutralization and proliferation assays, the data are expressed as the Mean ± SEM. Intra- and intergroup statistical analysis were performed by one-way or two-way ANOVA. Tukey's test was used for post hoc comparisons. To assess differences in the survival curve, data were analyzed with a log-rank test. All analyses were performed in GraphPad Prism software v.7.0. Differences were considered significant at a P value < .05.

3. Results

3.1. Construction and expression of recombinant vaccine vectors *in vitro*

To assess the potential use of G5 epitope as a DNA vaccine and the adjuvant effect of C3d-P28 complement, two plasmids were

engineered in pVAX1⁺, generating the vaccines pVaxG5 and chimeric pVaxF1 (Fig. 1A). These vaccines contained the synthetic G5 gene (189 bp) and fusion G5-C3d-P28 (333 bp), (Fig. 1B). To establish whether the recombinant protein G5, encoded in pVaxG5 and pVaxF1, is recognized by anti-rabies-human immunoglobulin, proteins from cell lysates were assayed by dot-blot analysis at 48 h post-transfection. As shown in Fig. 1C, the positive recognition of recombinant proteins G5 and G5-C3d-P28 by anti-rabies-human antibody was observed. In addition, recombinant C3d-P28 expressed in cells transfected with pVaxF1 was recognized by anti-C3d antibody.

3.2. DNA vaccines pVaxG5 and pVaxF1 induced VNA against RABV in mice

To evaluate the VNA response induced by DNA vaccines, BALB/c mice were immunized with 20 µg of DNA using the immunization schemes described in Fig. 2A. Seroconversion (>0.5 IU/ml) in mice immunized with pVaxG5 (9/9) and pVaxF1 (9/10) was observed from day 15. On all days, the ANOVA test showed significant differences between the groups (P value < .0001), while the Tukey analysis showed differences between all groups compared to the PBS group (P value ≤ .01) except on day 90, for which PBS vs pVaxG5 did not show significant differences. Titers of VNAs in the pVaxG5 group were higher at day 15 (5.3 IU/ml ± 1.4) than those induced by the pGQH and pVaxF1 vaccines (3.8 IU/ml ± 2.2 and 3.8 IU/ml ± 2.3, respectively). Nevertheless, the Tukey analysis did not show significant differences. Titers of VNAs in the pVaxG5 group decreased at day 90 (1.6 IU/ml ± 2.2) while in the pVaxF1 group, they instead showed sustained VNA levels of 3.5 IU/ml ± 2.2 until day 90. No VNAs were observed in the immunized PBS group (<0.5 IU/ml ± 0.14) (Fig. 2B). The ANOVA test on days 45 and 90 showed significant differences between the PBS group and all vaccinated groups (P value ≤ .0157) except the pVaxG5 group on day 90. All groups showed high levels of variation. These results show that DNA vaccines encoding the RABV recombinant G5 epitope were able to prime B cells for the production of VNAs against RABV.

3.3. Vaccination with pVaxF1 produced an improvement in survival

To evaluate whether the pVaxG5 and pVaxF1 vaccines can elicit protective immunity against RABV in mice, a challenge test with 22 LD50 of CVS was performed. The survival and clinical signs were monitored for 21 days. Considering the 50% survival rate of animals in the control PBS group, the survival shown in the pVaxG5 and pVaxF1 vaccinated groups increased by 27.7% and 50%, respectively. The curve analysis by the Log-rank test showed significant differences between pVaxF1 vs PBS (P = .025) and PBS vs pGQH (P = .017). Although the survival of the PBS group would estimate that at least 50% of the mice in all groups survived, there is a statistically significant increase in the survival of the pVaxF1 group (P value = .025) unlike that observed in the pVaxG5 group (P value = .27) (Fig. 3).

Most animals from the pVaxF1 group did not show clinical signs of rabies. While three mice showed ruffled fur on day 14, none of the animals in this group showed clinical signs on the following days. Based on the values of the clinical scores described in Section 2.7, animals from the pVaxF1 group had a mean score of 0. Animals from the pGQH group had a mean score of 0.3 because four animals started with rabies signs on the second day pi. Another animal started to show signs on day nine, and one more started to show signs on day 17. Three of them recovered until day seven pi, while the remaining three mice maintained clinical signs until day 21. Animals from the pVaxG5 group showed a mean score of 1.1 because two animals showed clinical signs from day seven. These mice were sacrificed on days 8 and 9. The remaining seven

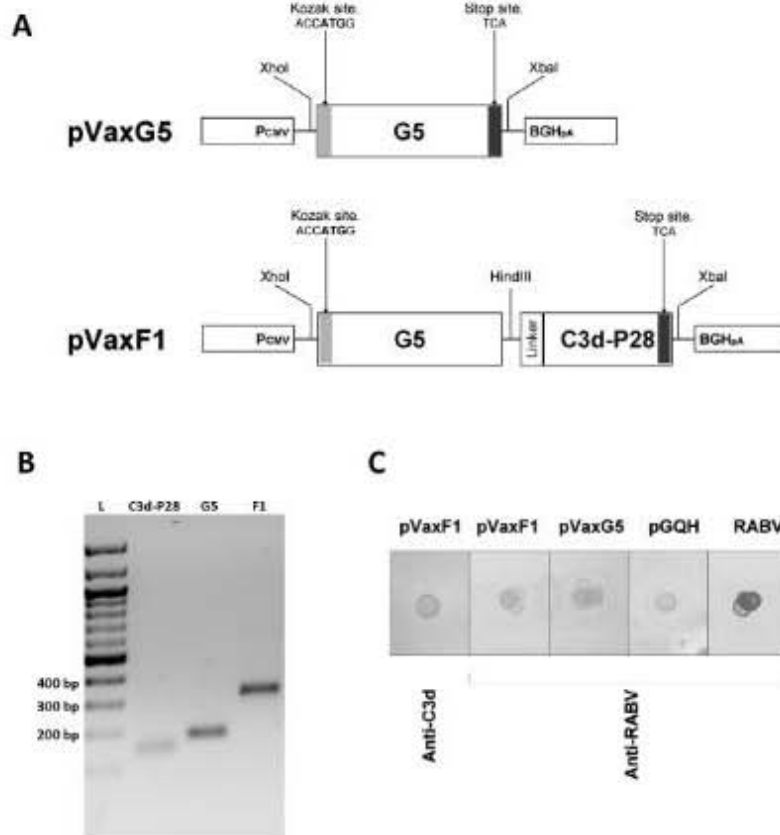


Fig. 1. Recombinant DNA vaccines. (A) Structure of pVaxG5 and pVaxF1 plasmid vaccines. (B) Synthetic sequences of G5 (189 bp), C3d-P28 (144 bp) and F1 (333 bp) generated by PCR. (C) Immunodetection of recombinant proteins using anti-RABV antibody. In addition, the C3-C3d-P28 protein encoded by plasmid pVaxF1 was traced with anti-C3d antibody.

did not show clinical signs until the end of the observation period. Mice from the PBS control group showed rabies signs from day 2, four mice were sacrificed as follows: one on day 4, two mice on day 9, and one on day 11. The remaining four mice in the PBS group maintained clinical signs of rabies until day 21 (mean score = 3) (Fig. 4).

3.4. Cell proliferation

The rabies-specific proliferative response induced by the DNA vaccines was assessed. As shown in Fig. 5, the proliferative response from group pVaxF1 was high (B cells = 7%, T cells CD4+ = 12% and CD8+ = 17%), similar to the pGQH group (B cells = 7%, T cells CD4+ = 13% and CD8+ = 16%).

Although the B cell proliferative response in the pVaxG5 group was similar to that shown in the pVaxF1 and pGQH groups, the pVaxG5 group showed a low proliferative response in the T cells populations (B cells = 5% and 2.5% for CD4+ and CD8+ T cell populations). Finally, in the PBS group the proliferation of the three

populations was low or non-existent (B cells = 2.3%, T cells CD4+ = 0.4% and CD8+ = 0%) (Fig. 5).

4. Discussion

This paper aimed to design and evaluate a new rabies DNA vaccine based on the linear G5 epitope of the RABV glycoprotein and the molecular adjuvant C3d-P28 in a mouse model. Two DNA vaccines were constructed in this study: pVaxG5 (G5 linear epitope) and pVaxF1 (G5-C3d-P28 molecular adjuvant). The findings showed that DNA vaccines pVaxG5 and pVaxF1 allowed the expression of the G5 linear epitope. G5 alone and G5 fused to C3d-P28 were recognized by anti-RABV antibodies, suggesting that their antigenic properties were maintained. Our results demonstrated that the pVaxG5 and pVaxF1 vaccines elicited titers of VN A > 0.5 IU/ml in mice sera.

VNA titers induced by immunization with the pVaxG5 vaccine decreased from 45 to 90 days, showing partial protection (27% more than the PBS group) and a clinical signs score of 1.1. In

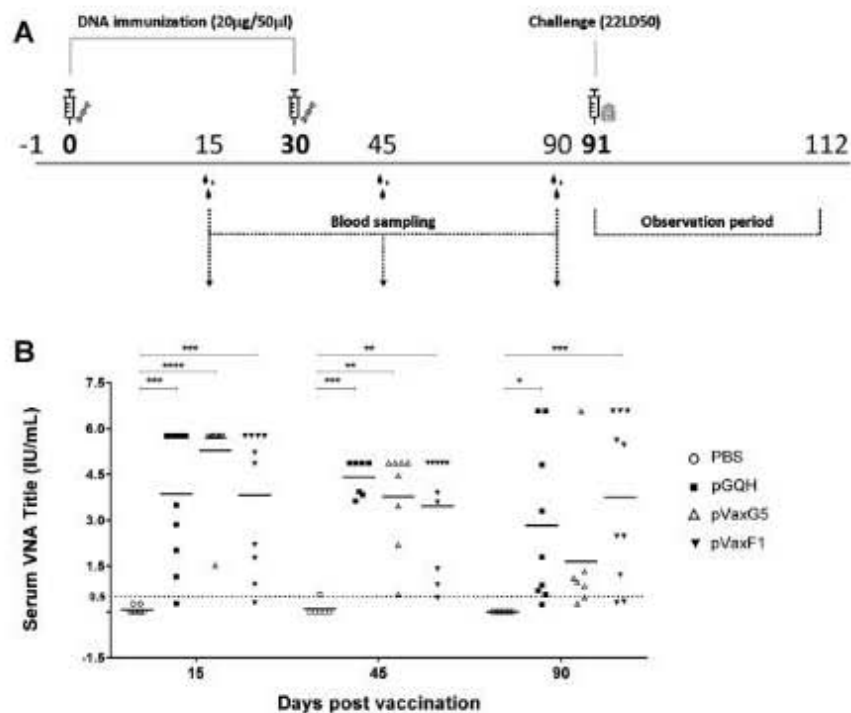


Fig. 2. (A) Immunization and sera sampling schedule. (B) Neutralizing antibodies level (IU/ml) recorded 15, 45, and 90 days post first inoculation. Pointed line indicated minimum level of VNA (0.5 IU/ml) needed to protect against rabies virus infection. () P value < .0157; (□) P value ≥ .0020; (▢) P value ≥ .0002; (▣) P value < .0001.

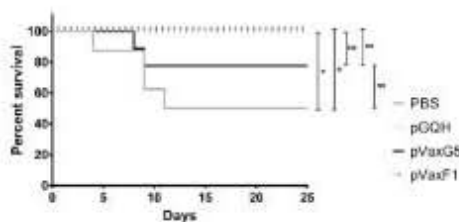


Fig. 3. Kaplan-Meier plot. Survival of mice challenged by i.c. route. BALB/c mice were immunized with 20 µg of DNA plasmids pGQH, pVaxF1, and pVaxG5 and a negative control group with PBS. The analysis by Log-rank showed significant difference in PBS vs pGQH P value = .0177 and PBS vs pVaxF1 P value = .023. After challenge, animals were observed daily.

contrast, the pVaxF1 vaccine elicited a sustained VNA response (>3 IU/ml) over a 90 day period, which coincided with a significantly higher survival rate (50%, P value = .025) with respect to the PBS group, with a clinical sign score of 0. This could be because the G5 antigenicity was enhanced by the C3d-P28 adjuvant. As previous studies have shown, the synthetic C3d-P28 peptide specifically binds to CR2 on the surface of resting B lymphocytes or follicular dendritic cells (FDC) [38]. Additionally, the high levels of expression of CR2 in the FDCs are essential for antigen retention in germinal centers for long time periods. This is not only important for the

generation of isotype switching, the neutralizing antibodies production, and the generation of immunological memory, but is also important for antigen availability and the regulation of humoral immune responses [39–41]. Future studies will be required to determine if chimeric protein G5-C3d-P28 is retained by FDCs in germinal centers.

As reported by Ullas et al. [37], the presence of the molecular adjuvant provides an improved protection reflected in the survival of the animals. Unlike the role of MyD88 in several signaling pathways that result in the formation of pro-inflammatory cytokines, the specific stimulation by C3d-P28 has an effect on the induction of plasma cells and the retention of the antigen in germinal centers by follicular dendritic cells [39].

While the VNA titres in the pVaxG5 and pVaxF1 groups exceeded the 0.5 IU/ml, intra-group variability was also observed, suggesting that *in vivo* transfection was variable. In this regard, a low number of antigen-presenting cells (APCs) within muscle tissue are considered a factor that might reduce the efficacy of DNA vaccines delivered by an intramuscular route [42].

As previously reported, rabies DNA vaccines based on G induce an immune response mediated by CD4+ and CD8+ T cells [43,44]. Since the germinal center of follicular T cells is responsible for providing help to B cells [45], the proliferation of spleen T cells from vaccinated mice was assessed. RABV-specific proliferation of CD4+ and CD8+ T cells from animals vaccinated with pVax-F1 was significantly higher than exhibited in the pVaxG5 group. While vaccination with pVaxG5 provided the priming and thus promoted the

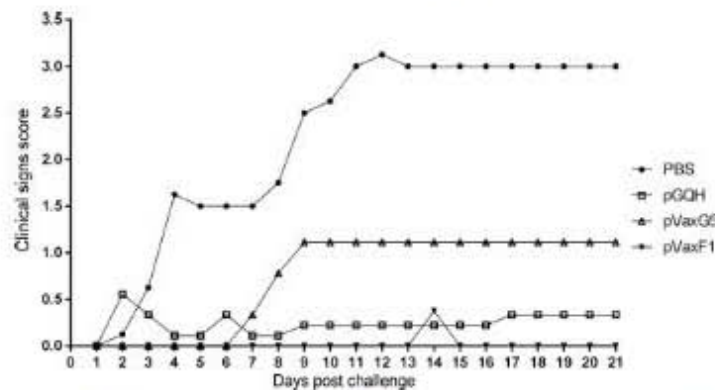


Fig. 4. Clinical signs score. Score 0 = No signs; score 1 = ruffled fur, score 2 = hunched-back posture and score 3 = early signs of paralysis. Clinical scores were based on modified classification of Takayama-Ito [36].

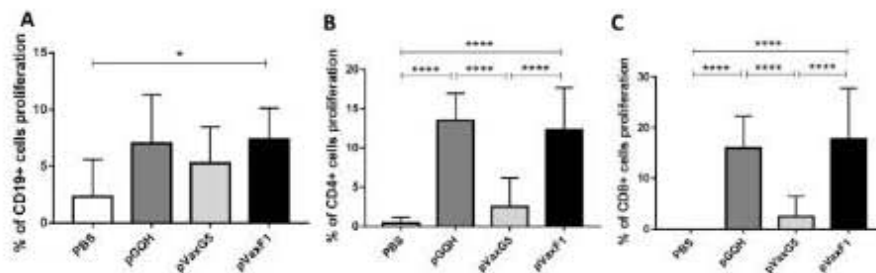


Fig. 5. Proliferation of cell population: (A) CD19: B cells, (B) CD4: Th cells and (C) CD8: Tc cells in each group. Spleen cells from vaccinated animals were recovered and stimulated with Wistar strain rabies virus. (□) P value = .044; (■) P value < .0001.

proliferation of CD19+ B cells necessary for antibody production, it was not sufficient to promote the proliferation of RABV-specific T-cells. These differences in the proliferation of CD4+ and CD8+ T cells from vaccinated mice with pVaxG5 and pVaxF1 could be explained by influencing the factors related to the antigenic half-life and antigenic persistence of the recombinant G5 epitope. In fact, the optimal clonal expansion and development of effector function of CD4+ and CD8+ T-cells requires prolonged antigen exposure [46,47].

CD8+ T cells are involved in the clearance of viral infected cells [48]. Recently, Luo et al. [49] developed a rabies vaccine with an acceptable safety profile, which included IL-6 as a molecular adjuvant, resulting in the enhanced production of VNAs and the faster clearance of resident RABV from host cells mediated by CD8+ T cells. In agreement with these findings, our results in the proliferative response of T CD8+ cells in pVaxF1 group suggest that this cellular subset is associated with the amelioration of clinical signs in animals.

In this study, the potential of the linear epitope G5 (pVaxG5) was demonstrated in the induction of VNAs and partial protection (27%). An enhancement in protection (50%) was observed in mice immunized with the pVaxF1 vaccine, while a protection of 20% was observed in mice immunized with the pVaxG5 vaccine when the immunization scheme consisted of two immunizations with dosing intervals of two weeks and high lethal doses of CVS were used (data not shown). This suggests a kinetic role of the G5

epitope/C3d-P28 adjuvant, as a critical factor in the generation of protection. Future studies will be needed to characterize this phenomenon.

In conclusion, this study demonstrated that the linear G5 epitope is a potential candidate for the development of a DNA vaccine against rabies. The addition of the C3d-P28 adjuvant in vaccine formulation enhanced protection up to 50% and induced a sustained VNA response and RABV specific T cell proliferation, without clinical signs against lethal challenge in mice. Thus, the use of the G5 epitope fused to the C3d-P28 adjuvant can be an alternative in the development of a new generation DNA vaccine against RABV.

Conflict of interest

The authors have no conflicts of interests to declare.

Acknowledgements

The first author acknowledges the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, for the academic formation received during his studies. We thank Dr. Juan Carlos Zenteno for his support in the DNA sequencing of plasmids, the personnel of UIMI-IMSS for their technical assistance and the UNAM Academic Writing personal (English-language instructors) for provided assistance with English

grammar and vocabulary. This work was supported by a PhD Fellowship from CONACYT (172491/172491) and the Programa de Formación de Investigadores-IMSS (99092365). The project was approved by the IMSS Local Research and Bioethics Committee (No. 2012-3603-85) and was supported by grants from the IMSS-FIS (FIS/IMSS/PROT/MD13/1266).

Appendix A. Supplementary material

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.11.047>.

References

- Zhu S, Guo C. Rabies control and treatment: from prophylaxis to strategies with curative potential. *Viruses* 2010;8:8279. <https://doi.org/10.3390/v8110279>
- WHO. WHO expert consultation on rabies. 2nd ed. Geneva: WHO technical report series; 2013.
- Ito N, Moseley GW, Sugiyama M. The importance of immune evasion in the pathogenesis of rabies virus. *J Vet Med Sci* 2010;78:1089–98. <https://doi.org/10.1177/0974646010386746>
- Kaur M, Garg R, Singh S, Bhattacharya R. Rabies vaccines: where do we stand, where are we heading? *Expert Rev Vaccines* 2013;14:305–61. <https://doi.org/10.1186/1745019813000074>
- Arribas-Ceballos R, Karanantsos D, Aguilar-Setién A. Control of canine rabies in developing countries: key features and animal welfare implications. *Rev Sci Tech* 2014;33:211–21.
- Panfili L, Chamberland R. *Nouvelle Communications sur la rage*. *CR Acad Sci* 1884;96:457–61.
- Ertl HC. Novel vaccines to human rabies. *PLoS Negl Trop Dis* 2009;3:e313. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000115>
- Starodubova ES, Pirozhikova OA, Kuzmenko YV, Latanova AA, Yarygina EI, Karpov VL. Rabies vaccines: Current status and prospects for development. *Mol Biol (Mosk)* 2015;48:577–84. <https://doi.org/10.1007/s12267-015-0170-9>
- Benmansour A, Leblais H, Goujon P, Tuffereau C, Gaultin Y, Hamani A, Lafay E. Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J Virol* 1991;65:4198–203.
- Publication WHO. Rabies vaccines: WHO position paper—recommendations. *Vaccine* 2010;28:7140–2. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.08.044>
- Turner GS. Immunoglobulin (IgG) and (IgM) antibody responses in rabies vaccine. *J Gen Virol* 1978;49:595–604.
- Hooper DC, Morimoto K, Bette M, Weibe E, Koprowski R, Dietzschold R. Collaboration of antibody and inflammation in clearance of rabies virus from the central nervous system. *J Virol* 1998;72:2711–5.
- Adarsh S, Singh PK, Yadav DK, Shukrawar M, Mishra S, Sawant SV, Tuli R. High level expression of surface glycoprotein of rabies virus in tobacco leaves and its immunoprotective activity in mice. *J Biotechnol* 2005;239:1–14.
- Huang H, Xiao S, Qin J, Jiang Y, Yang S, Li T, Cao Y, Li Z, Li T, Su X, Yuan Y, Xu F, Wang H, Chen H, Xia X. Construction and immunogenicity of a recombinant nucleocapsid baculovirus expressing the glycoprotein of rabies virus in mice. *Arch Virol* 2011;156:731–8. <https://doi.org/10.1007/s00705-010-1090-4>
- Kaur M, Saxena A, Rai A, Bhattacharya R. Rabies DNA vaccine encoding lysosome-targeted glycoprotein supplemented with Emulsigen-D confers complete protection in pre-exposure and post-exposure studies in BALB/c mice. *FASEB J* 2010;24:173–81. <https://doi.org/10.1096/fj.09.17004>
- Li L, Petrovsky N. Molecular mechanisms for enhanced DNA vaccine immunogenicity. *Expert Rev Vaccines* 2010;13:313–29. <https://doi.org/10.1186/14752875101147400>
- Touhri L, Ahmed SB, Chinnou Y, Daoud R, Bahoul C. Design of different strategies of multivalent DNA-based vaccination against rabies and canine distemper in mice and dogs. *Viral J* 2012;9:319. <https://doi.org/10.1186/1745-2758-9-319>
- Ullat PT, Mathhusudana SN, Desai A, Sagar BK, Jayaraman G, Rajesh VB, Jayaraman N. Enhancement of immunogenicity and efficacy of a plasmid DNA rabies vaccine by nanofemulation with a fourth-generation amine-terminated poly(ether imine) dendrimer. *Int J Nanomed* 2014;9:527–34. <https://doi.org/10.2147/ijn.s71413>
- Bonhôte K, Agache M, Kamran T, Muehlgayr GR, Chahiri M, Chiklami AR. A comparative approach between heterologous prime-boost vaccination strategy and DNA vaccinations for rabies. *Arch Iran Med* 2012;16:223–7. doi: 10.3184/ajid.009.
- Ludmell DL, Kay NB, Paswell MJ, Swatt LC, Hadden CA, Shacklock PJ, Sanderlin DS, Rupprecht CE. DNA immunization protects nonhuman primates against rabies virus. *Nat Med* 1998;4:649–52.
- Perera F, Jacob V, Aguilar-Setién A, Iera-Rubio E, Jaller C, Gomez-Ramos E, Aubrey M, Clagett F, Tundo N. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine* 1999;17:479–85.
- Tesoro-Cruz E, Calderón-Rodríguez R, Hernández-González R, Blanco-Fajela F, Aguilar-Setién A. Intradermal DNA vaccination in ear pinnae is an efficient route to protect cats against rabies virus. *Vet Res* 2008;39:16. <https://doi.org/10.1186/1745-2758-9-16>
- Tesoro-Cruz E, Hernández-González R, Alonso-Morales R, Aguilar-Setién A. Rabies DNA vaccination by the intranasal route in dogs. *Dev Biol (Basel)* 2008;129:221–31.
- Ludmell DL, Swatt LC. Post-exposure DNA vaccination protects mice against rabies virus. *Vaccine* 2001;19:3408–73.
- Tesoro-Cruz E, Peña-Romero IA, López-Méndola JC, Ortez-Suárez S, Hernández-González R, Fajela FB, Pérez-Torres A, Aguilar-Setién JA. Efficient post-exposure prophylaxis against rabies by applying a four-dose DNA vaccine intranasally. *Vaccine* 2008;26:6936–44. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.09.046>
- Okamoto S, Ito T, Tsuyoshi S, Nakao J, Hatahira F, Yamamoto M, Gredy JA, No Y, Kawak A. Studies on the structure and antigenic properties of rabies virus glycoprotein analogs produced in yeast cells. *Vaccine* 1999;17:205–18.
- Dietzschold R, Gore M, Marchadier G, Wu HJ, Bumschoen HM, Ohno S, L. Wunner WH, Ertl HC, Osterhaus AD, Koprowski H. Structural and immunological characterization of a linear virus-neutralizing epitope of the rabies virus glycoprotein and its possible use in a synthetic vaccine. *J Virol* 1990;64:3054–5.
- Bumschoen H, Gore M, Clazzen G, Uytendaele PG, Dietzschold R, Wunner WH, Osterhaus AD. Characterization of a new virus-neutralizing epitope that denotes a sequential determinant on the rabies virus glycoprotein. *J Gen Virol* 1989;70:291–6.
- Zhao XL, Yin J, Chen WQ, Jiang M, Yang G, Yang ZH. Generation and characterization of human monoclonal antibodies to G3, a linear neutralization epitope on glycoprotein of rabies virus, by phage display technology. *Microbiol Immunol* 2008;52:85–93. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0473.2008.01016.x>
- Van der Meulen RW, Limpitkij J, Green J, Uytendaele PG, Melker EE, Osterhaus AD. Structural and functional studies on a unique linear neutralizing antigenic site (G3) of the rabies virus glycoprotein. *J Gen Virol* 1993;74:1539–45.
- Niederhäuser S, Bruggler D, Zahon ML, Vogt HR, Peterhans E, Zanoni R, Bertoni C. A synthetic peptide encompassing the G3 antigenic region of the rabies virus induces high avidity but poorly neutralizing antibody in immunized animals. *Vaccine* 2008;26:6749–52. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2008.10.066>
- Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodwin CE, Pearson DT. Ctd of complement a2a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. *Science* 1990;271:348–50.
- Bower J, Ross TM. A minimum C3d binding domain of C3d enhances immunity following vaccination. *Adv Exp Med Biol* 2008;598:245–64.
- Sambrook J, Russell DW. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor; 2001.
- Kaján MM, Koprowski H, Meslin FX. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva: WHO; 1980.
- Takayama-Ho M, Lim CK, Nakamichi K, Kakiuchi S, Horiya M, Posada-Herrera G, Kurane I, Saigo M. Reduction of animal suffering in rabies vaccine potency testing by introduction of humane endpoints. *Biologicals* 2016. <https://doi.org/10.1016/j.biolog.2016.12.002>. pii: S1045-1056(16)30167-1.
- Ullat PT, Desai A, Mathhusudana SN. Immunogenicity and efficacy of a plasmid DNA rabies vaccine incorporating MyD88 as a genetic adjuvant. *Clin Exp Vaccine Res* 2014;3:202–11. <https://doi.org/10.1016/j.cavr.2014.3.202>
- Wang LX, He W, Guan QD, Chen YN, Wang Y, Jiang SD. Construction of C3d-F28 epitope to enhancement of immune responses against H5N1-pH2E5 induced by gene immunization. *World J Gastroenterol* 2004;10:2072–7.
- Hersters BA, Myers RC, Carroll MC. Follicular dendritic cells: dynamic antigen libraries. *Nat Rev Immunol* 2014;14:495–504. <https://doi.org/10.1038/nri3684>
- Srivastava B, Carroll MC. Complement receptors CR21 and CR115 in humoral immunity. *Immunity Rev* 2007;219:157–66.
- Vickora CD, Mesin L. Clonal and cellular dynamics in germinal centers. *Curr Opin Immunol* 2014;28:50–6. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.07.010>
- Kutzbauer MA, Weiner DB. DNA vaccines: ready for prime time? *Nat Rev Genet* 2008;9:776–88. <https://doi.org/10.1038/nrg2412>
- Xiang ZQ, Spitalnik S, Tran M, Wunner WH, Cheng J, Ertl HC. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus. *Virology* 1994;199:112–40.
- Johnson N, Cunningham AF, Fooks AR. The immune response to rabies virus infection and vaccination. *Vaccine* 2010;28:1890–901. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2010.07.024>
- Crotty S. T follicular helper cell differentiation, function, and roles in disease. *Immunity* 2014;41:529–42. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2014.10.004>
- Crotty JM, Johnston CM, Muehleberg M. CD8 T cell clonal expansion and development of effector function require prolonged exposure to antigen, costimulation and signal-3 cytokine. *J Immunol* 2003;171:5165–71.
- Tan HH, Miller MB, Kang M, Pelet JM, Rada VM, Foley BA, Ho JC, Santori S, Crampson J, Redden AC, Sander RW, Moore JF, Crilly S, Langer R, Anderson DG, Chakrabarty AK, Irvine DJ. Sustained antigen availability during germinal center initiation enhances antibody responses to vaccination. *Proc Natl Acad Sci USA* 2016;113:E8828–48.
- Zhang N, Bevan MJ. CD8 (+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity* 2011;35:161–8. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.07.011>
- Luo J, Zhang B, Wu Y, Tian Q, Zhao J, Liu Z, Zhang Q, Mei M, Luo Y, Guo X. Expression of interleukin-6 by a recombinant rabies virus enhances its immunogenicity as a potential vaccine. *Vaccine* 2017;35:938–44. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2016.11.095>