



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA

**“CONSTRUCCION Y PRUEBA DE UNA VACUNA GENICA CONTRA
EL POLIOVIRUS TIPO I EN UN MODELO MURINO.”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADA EN INVESTIGACION BIOMÉDICA BÁSICA

P R E S E N T A

ELIZABETH RODRIGUEZ SALINAS



DIRECTORA: DRA. LETICIA ROCHA ZAVALETA

MEXICO, D. F.

FEBRERO 2005

m340949



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres y hermana por su cariño y apoyo incondicional y por enseñarme que en las dificultades están las oportunidades.

A Bernardo por ser mi aurn en el azul profundo y por enseñarme que ante el valor y la perseverancia los obstáculos se desvanecen.

A Angélica por su amistad y por enseñarme que todos tenemos una chispa de locura que debemos conservar.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Leticia Rocha Zavaleta por la dirección y el apoyo que me brindó durante la elaboración de este trabajo.

Al Dr. Raúl Andino y al Dr. Marco Vignuzzi por el invaluable apoyo proporcionado durante el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del Jurado Examinador: Dra. Beatriz Gómez García, Dra. Leticia Rocha Zavaleta, Dra. Gladis Fragoso González, Dr. Luis Padilla Noriega y Dr. Raúl Chávez Sánchez por sus críticas y sugerencias en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Verónica Monroy Martínez por la guía, el apoyo y los excelentes comentarios brindados durante la elaboración de este trabajo.

A la Dra. Blanca Ruíz Ordaz por el generoso apoyo otorgado durante el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Rafael Camacho Carranza por sus valiosos comentarios y consejos.

ÍNDICE GENERAL

| Sección | Página |
|---|---------------|
| 1. Índice de abreviaturas | |
| 2. Índice de figuras | |
| 3. Índice de tablas | |
| 4. Resumen | 1 |
| 5. Introducción | 2-19 |
| I. Poliomielitis | 2 |
| II. Poliovirus | 2-6 |
| III. Vacunas contra la polio | 6-8 |
| • Vacuna inactivada contra la polio | 7 |
| • Vacuna atenuada contra la polio | 7-8 |
| IV. Erradicación | 9 |
| V. Poliovirus derivados de la vacuna oral contra la polio | 9-13 |
| • Epidemias causadas por PVDVc | 10-12 |
| • Control de las epidemias | 12-13 |
| VI. Vacunas de ADN | 13-17 |
| VII. Modelos animales | 17-19 |
| 6. Planteamiento del problema | 20-21 |
| 7. Objetivos | 22 |
| • Objetivos generales | 22 |
| • Objetivos específicos | 22 |
| 8. Hipótesis | 22 |
| 9. Materiales y métodos | 23-34 |
| • Plásmidos | 23 |
| • Virus | 23 |

| | |
|--|-------|
| • Células | 23 |
| • Sueros y anticuerpos | 23-24 |
| • Animales | 24 |
| • Extracción y purificación del ADN plasmídico | 24-25 |
| • Reacción en cadena de la polimerasa | 25-27 |
| • Construcción de las vacunas de ADN | 27-28 |
| • Secuenciación | 28 |
| • Cultivo de colección de poliovirus silvestre tipo I | 28-29 |
| • Titulación del cultivo de colección de poliovirus silvestre tipo I | 29 |
| • Infección | 29 |
| • Transfección | 30 |
| • Inmunocitoquímicas de células transfectadas | 30-31 |
| • Extracción de proteínas totales | 31 |
| • Western blot | 31-32 |
| • Marcaje metabólico radiactivo | 32 |
| • Radioinmunoprecipitación | 32 |
| • Fusiones con GFP | 32-33 |
| • Detección de fluorescencia | 33 |
| • Dosis letal 50 (LD ₅₀) | 33 |
| • Vacunación | 33 |
| • Obtención de suero | 34 |
| • Ensayos de neutralización | 34 |
| • Reto viral | 34 |
| | |
| 10. Resultados | 35-49 |
| • Construcción de las vacunas de ADN | 35-36 |
| • Expresión de las proteínas de la cápside de poliovirus | 37-43 |
| • Generación de anticuerpos neutralizantes | 44-45 |
| • Supervivencia de los ratones al reto viral | 46-49 |

| | |
|------------------|-------|
| 11. Discusión | 50-57 |
| 12. Conclusiones | 58 |
| 13. Perspectivas | 59 |
| 14. Referencias | 60-65 |

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

| | |
|----------------------------------|--|
| ³⁵ S | isótopo radiactivo de la metionina |
| ADN | ácido desoxirribonucleico |
| ADNc | ácido desoxirribonucleico complementario |
| ARN | ácido ribonucleico |
| ATCC | American Type Culture Cell |
| BCR | receptor de células B |
| BSA | albúmina sérica bovina |
| CH ₃ COOK | acetato de potasio |
| CMV | citomegalovirus |
| DMEM | Medio Eagle Modificado por Dulbecco |
| EDTA | ácido etilendiaminotetraacético |
| ELISA | ensayo enzimático inmunoabsorbente |
| GFP | proteína verde fluorescente |
| H ₂ O ₂ | peróxido de hidrógeno |
| IRES | sitios internos de unión a ribosoma |
| KCl | cloruro de potasio |
| KH ₂ PO ₄ | fosfato de potasio monobásico |
| LB | Luria Bertrani |
| LD ₅₀ | dosis letal 50% |
| MHC I | complejo mayor de histocompatibilidad clase I |
| MHC II | complejo mayor de histocompatibilidad clase II |
| ml | mililitro(s) |
| moi | multiplicidad de infección |
| Na ₂ HPO ₄ | fosfato de sodio dibásico |
| NaCl | cloruro de sodio |
| NaHCO ₃ | bicarbonato de sodio |
| NaOH | hidróxido de sodio |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |
| PBS | buffer saturado de fosfatos |
| PCR | reacción en cadena de la polimerasa |
| pfu | unidades formadoras de placa |
| PPAV | poliomielitis parálitica asociada a la vacuna oral contra la poliomielitis |
| PVDV | poliovirus atenuados derivados de la vacuna oral contra la poliomielitis |

| | |
|--------------------------|---|
| PVDVc | poliovirus atenuados derivados de la vacuna oral contra la polio circulantes |
| PVDVI | poliovirus atenuados derivados de la vacuna oral contra la polio provenientes de individuos inmunocomprometidos |
| PVR | receptor de poliovirus humano |
| RNT | región no traducida |
| SDS | dodecil sulfato de sodio |
| SDS-PAGE | electroforesis en gel de acilamida con dodecil sulfato de sodio |
| SFB | suero fetal bovino |
| SNC | sistema nervioso central |
| TCID₅₀ | dosis infecciosa en cultivo de tejidos 50% |
| TCR | receptor de células T |
| TgPVR | transgénico para el receptor humano de poliovirus |
| Tris-Cl | tris (hidroximetil) aminometano hidróxido clorhidrato trometamol |
| vADN1-PV | primera vacuna de ADN contra poliovirus |
| vADN2-PV | segunda vacuna de ADN contra poliovirus |
| VIP | vacuna inactivada contra la poliomiелitis |
| VOP | vacuna oral contra la poliomiелitis |
| VP | proteína viral |

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

| Número | Título | Página |
|--------|---|--------|
| 1 | Organización del genoma del poliovirus. | 3 |
| 2 | Morfogénesis de la cápside de poliovirus. | 4 |
| 3 | Incidencia de la poliomielitis después de la introducción de la VIP y la VOP. | 6 |
| 4 | Mecanismos de generación de la respuesta inmune humoral y celular por las vacunas de ADN. | 15 |

Resultados

| Número | Título | Página |
|--------|--|--------|
| 5 | Vacunas de ADN contra la polio. | 35 |
| 6 | Plásmido que constituye la vacuna vADN1-PV. | 36 |
| 7 | Plásmidos que constituyen la vacuna vADN2-PV. | 36 |
| 8 | Inmunocitoquímicas de células transfectadas. | 38 |
| 9 | Western blot de extractos de proteínas totales de células HeLa transfectadas con el plásmido pVP4-1. | 39 |
| 10 | Western blot de extractos de proteínas totales de células HeLa transfectadas con los plásmidos pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4 a 24 horas. | 40 |
| 11 | Radioinmunoprecipitación. | 41 |
| 12 | Expresión de la proteína verde fluorescente. | 43 |
| 13 | Esquema de vacunación para las vacunas de ADN. | 44 |
| 14 | Título de anticuerpos neutralizantes en el suero de ratones vacunados con tres dosis de vacuna génica. | 45 |
| 15 | Supervivencia de los ratones vacunados retados con poliovirus silvestre tipo 1. | 48 |
| 16 | Supervivencia y mortalidad de los ratones vacunados con las vacunas génicas. | 49 |

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción

| Número | Título | Página |
|--------|--|--------|
| 1 | Sitios antigénicos del poliovirus determinados a partir de poliovirus atenuados. | 6 |
| 2 | Mutaciones de poliovirus atenuados utilizados en la VOP. | 8 |
| 3 | Epidemias causadas por PVDVc recombinantes. | 10 |
| 4 | Epidemias posiblemente causadas por PVDVc. | 12 |
| 5 | Análisis comparativo de las vacunas de ADN, vacunas atenuadas y vacunas inactivadas. | 16 |

Resultados

| Número | Título | Página |
|--------|---|--------|
| 6 | Manifestación de síntomas característicos de la polio en ratones cPVR inoculados con poliovirus silvestre tipo 1. | 46 |

RESUMEN

Recientemente han surgido epidemias de poliomielitis parálitica ocasionadas por poliovirus derivados de la vacuna oral contra la polio circulantes (PVDVc). Lo anterior se debe a que los poliovirus atenuados de la vacuna oral contra la polio (VOP) recuperan la capacidad de transmitirse y de causar parálisis mediante reversión y recombinación. En este trabajo se propone la construcción y prueba de una vacuna génica o de ADN en contra de la poliomielitis. Al igual que la VOP, una vacuna de ADN, podría inducir una respuesta inmune protectora en contra del poliovirus, pero a diferencia de la VOP, no conllevaría el riesgo de reversión del virus. Se construyeron dos vacunas de ADN, la primera, denominada vADN1-PV, consistió en un plásmido con los cuatro genes que codifican las proteínas de la cápside. La segunda, denominada vADN2-PV, consistió en un conjunto de cuatro plásmidos, donde cada plásmido contenía uno de los genes que codifican las proteínas de la cápside. La expresión de las proteínas codificadas por los genes contenidos en las vacunas fue evaluada mediante inmunocitoquímica, western blot, radioinmunoprecipitación y el uso de la proteína verde fluorescente como gen reportero. Los resultados sugieren que el plásmido que constituye la vADN1-PV expresó poliproteínas no procesadas y que cada uno de los plásmidos que constituyen la vADN2-PV expresó indirectamente cada una de las proteínas de la cápside. La capacidad de las vacunas de inducir una respuesta inmune protectora fue evaluada en ratones transgénicos para el receptor humano del poliovirus. Se observó que ninguna de las vacuna de ADN protegió en contra de una infección letal de poliovirus silvestre tipo 1. Los ratones vacunados generaron anticuerpos con capacidad neutralizante *in vitro*, como se observó en los ensayos de neutralización. Los niveles de anticuerpos neutralizantes en los ratones vacunados con la vADN2-PV fueron más altos que los observados en los ratones vacunados con la vADN1-PV.

INTRODUCCIÓN

I. Poliomiелitis.

La poliomiелitis, también llamada polio, es una enfermedad parálitica que afecta principalmente a la población infantil. El nombre “*poliomiелitis*” proviene de las raíces griegas “*polios*” que significa gris y “*myelos*” que significa médula. La característica principal de la enfermedad es la destrucción de las neuronas motoras que constituyen la materia gris de la médula espinal (Minor 1999).

La poliomiелitis es una enfermedad infecciosa causada por el poliovirus. Éste ingresa al individuo por vía oral a través de material contaminado que viaja al tracto gastrointestinal. Ahí, el virus se replica, primero, en las placas de Peyer y después, en los nódulos linfáticos mesentéricos. Posteriormente, el virus ingresa al torrente sanguíneo, genera viremia, cruza la barrera hematoencefálica e invade el sistema nervioso central (SNC). Finalmente, el poliovirus se replica en las neuronas motoras y las destruye (Minor 1999).

La poliomiелitis se clasifica en base a la severidad del cuadro clínico en: infección subclínica, infección abortiva y poliomiелitis parálitica. La infección subclínica constituye del 91% al 96% de las infecciones y se caracteriza por ser asintomática. La infección abortiva constituye del 4% al 8% de las infecciones y se caracteriza por síntomas semejantes a los ocasionados por influenza. La poliomiелitis parálitica constituye del 0.1% al 1% de las infecciones y se caracteriza por dolor muscular, pérdida de reflejos superficiales, incremento de reflejos en los tendones, espasmos musculares en piernas y en espalda y parálisis asimétrica en los miembros motores inferiores (Strebel et al., 1992).

II. Poliovirus.

El agente etiológico de la poliomiелitis es el poliovirus. Éste pertenece a la familia *Picornaviridae*, al género de los enterovirus. El poliovirus es un virus icosaédrico, no envuelto, con un diámetro de ~30 nm. El genoma viral consiste en una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva con una longitud de ~7.5 kb que contiene regiones no traducidas en los extremos 3' y 5'. El extremo 3' contiene una cola de poli (A) de 70 a 100 nucleótidos. El extremo 5' está conservado en todos los enterovirus, contiene sitios internos de unión a ribosoma (IRES) y

contiene un único marco abierto de lectura que codifica una poliproteína de 247 kDa (Howley et al., 2001).

La poliproteína es procesada cotraduccionalmente por proteasas virales en 3 regiones, P1, P2 y P3. La región P1 codifica las proteínas de la cápside VP1 (33 kDa) y VP3 (26 kDa) y el polipéptido VP0 (37.4 kDa). Posteriormente, el polipéptido VP0 es procesado en las proteínas de la cápside VP2 (30 kDa) y VP4 (7.4 kDa). Las regiones P2 y P3 codifican proteínas no estructurales involucradas en el procesamiento de la poliproteína viral: 2A^{pro}, 3C^{pro}, 3CD^{pro} y en la replicación del genoma viral: 2B, 2C, 3AB, 3B^{VPg}, 3CD^{pro}, 3D^{pol} (Figura 1) (Flint et al., 2000).

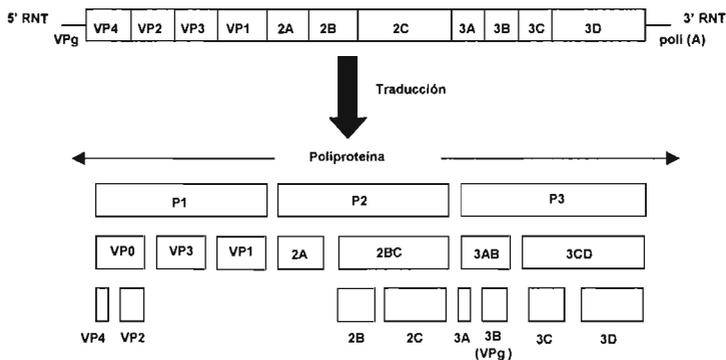


Figura 1. Organización del genoma de poliovirus. El genoma de poliovirus consiste en una cadena sencilla de RNA de polaridad positiva con una longitud de ~7.5 kb con regiones no traducidas (RNT) en los extremos 5' y 3'. El genoma viral contiene un único marco abierto de lectura que codifica una poliproteína de 247 kDa. Ésta es procesada cotraduccionalmente por proteasas virales en las regiones P1, P2 y P3. La región P1 codifica las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4 y las regiones P2 y P3 codifican las proteínas no estructurales 2B, 2C, 3AB, 3B^{VPg}, 3CD^{pro}, 3D^{pol} (Howley et al., 2001).

Las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4, constituyen la cápside que consiste en 60 copias de cada una de ellas. VP1, VP2 y VP3 se localizan en la superficie de la cápside, mientras que VP4 se localiza en la parte interna de la cápside. VP1, VP2 y VP3 se unen entre sí para formar protómeros. Éstos son la unidad estructural del poliovirus a partir de la cual se forman las subunidades que constituyen la cápside.

La proteasa viral 3CD^{pro} procesa la región P1 en las proteínas VP3 y VP1 y en el polipéptido VP0 que consiste en las proteínas VP4 y VP2 no procesadas. VP0, VP3 y VP1 se ensamblan espontáneamente en protómeros de 5 S. Los protómeros se ensamblan entre sí

espontáneamente y forman pentámeros de 14 S que a la vez se ensamblan entre sí espontáneamente y forman cápsides vacías de 80 S. El genoma viral se inserta en las cápsides vacías y forma el provirión de 150 S. El polipéptido VP0 es procesado en las proteínas VP2 y VP4 para producir el virión de poliovirus de 160 S (Howley et al., 2001) (Figura 2).

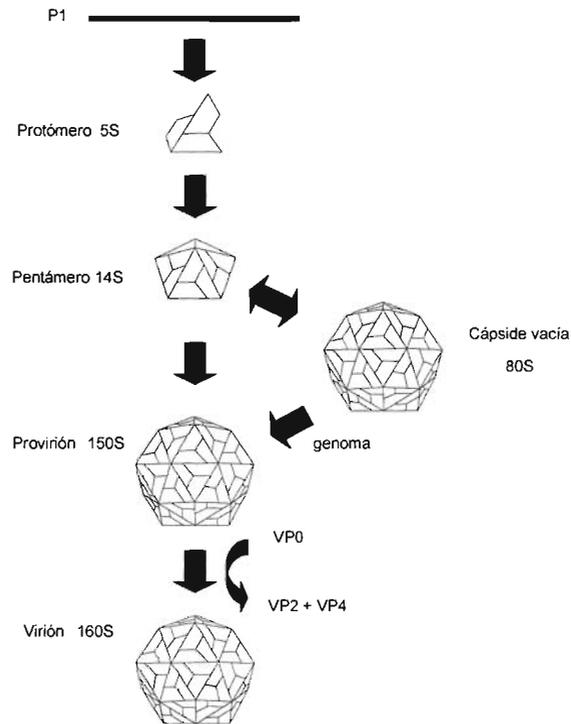


Figura 2. Morfogénesis de la cápside. La proteasa viral 3CD^{pro} procesa la región P1 en las proteínas VP3 y VP1 y en el polipéptido VP0 que se ensamblan de manera consecutiva en protómeros (5 S), pentámeros (14 S) y cápsides vacías (80 S). Posteriormente, el genoma viral se inserta en las cápsides vacías y forma el provirión (150 S). Finalmente, el polipéptido VP0 es procesado en las proteínas VP2 y VP4 para producir el virión de poliovirus (160 S) (Howley et al., 2001).

Se ha estudiado el ensamblaje de las proteínas de la cápside de poliovirus *in vitro* utilizando virus de vaccinia y baculovirus recombinantes (Ansardi et al., 1991, Brautigam et al., 1993). En ambos casos, la expresión de las proteínas de la cápside procesadas fue detectada mediante inmunoprecipitación con suero anti-poliovirus a partir de proteínas totales de células infectadas. También, se demostró en ambos casos que las proteínas de cápside son procesadas al igual que

en una infección por poliovirus para su posterior autoensamblaje en cápsides vacías. Sin embargo, en el caso del sistema de baculovirus los niveles de expresión detectados previo al autoensamblaje de las proteínas fueron muy bajos y las proteínas tuvieron una vida media mayor a una hora (Brautigam et al., 1993).

El peso molecular de las proteínas virales inmunoprecipitadas observado en geles de SDS-PAGE varía ligeramente con respecto a los pesos moleculares originales. Cabe mencionar que la proteína VP4 no es inmunoprecipitada individualmente, sino como parte del polipéptido VP0 (Ansardi et al., 1991 y 1995).

Las secuencias de VP1, VP2 y VP3 no son homólogas, sin embargo, las tres proteínas tienen la misma topología: forman dominios compuestos por dos hojas antiparalelas β -plegadas que proporcionan densidad y rigidez a la cápside. Las hojas forman una estructura semejante a una cuña con dobleces que conecta las cadenas de las tres proteínas. Los dobleces sobresalen de la superficie de la partícula viral y le dan a cada subunidad de la cápside una morfología característica y distintas propiedades antigénicas (Howley et al., 2001).

Los sitios antigénicos del poliovirus están localizados en los dobleces que decoran las proteínas VP1, VP2 y VP3. Consecuentemente, conforman epítopes conformacionales que constituyen el blanco de los anticuerpos neutralizantes (Tabla 1) (Herremans et al., 2000).

Los sitios antigénicos fueron identificados mediante el aislamiento y la caracterización de poliovirus mutantes resistentes a la neutralización por suero antipoliovirus y mediante el mapeo de epítopes con anticuerpos neutralizantes monoclonales. Los poliovirus mutantes fueron seleccionados mediante ensayos de formación de placa en presencia de suero anti-poliovirus. Los poliovirus mutantes fueron aislados y crecidos a partir de las placas formadas. Posteriormente, el material genómico de los poliovirus crecidos fue extraído y secuenciado. Los epítopes resistentes a la neutralización fueron identificados mediante ensayos de neutralización utilizando anticuerpos monoclonales. Los poliovirus resistentes a la neutralización fueron aislados y crecidos para la posterior obtención y secuenciación de su genoma viral (Minor et al., 1986).

Tabla 1. Sitios antigénicos del poliovirus determinados a partir de poliovirus atenuados.

| Sitio antigénico | | Proteína estructural | Residuos de aminoácidos | Propiedades |
|------------------|-----------|----------------------|-------------------------|--|
| N-Ag I | | VP1 | 89-100 | - Inmunorecesivo en serotipo 1 - Inmunodominante en serotipos 2 y 3 - Sensible a tripsina intestinal en serotipo 1 y 3 |
| N-Ag II | N-Ag IIA | VP1 | 220-222 | - Presente en serotipo 1 |
| | N-Ag IIB | VP2 | 169-170 | - Presente en serotipos 1 y 3 |
| N-Ag III | N-Ag IIIA | VP1 | 286-290 | - Presente en serotipo 3 - No es inmunogénico en serotipo 1 |
| | N-Ag IIIB | VP3 | 58-59 | - Presente en serotipos 1 y 3 - Inmunodominante en sero tipo 1 - Involucrado en la respuesta inmune en mucosas |

Herremans et al., 2000

III. Vacunas contra la polio.

Actualmente existen dos vacunas efectivas contra la poliomielititis que han reducido notablemente la incidencia de la enfermedad a nivel mundial: la vacuna inactivada (VIP), creada por Jonas Salk en 1955 y la vacuna atenuada, creada por Albert Sabin en 1962 (Blume et al., 2000) (Figura 3).



Figura 3. Incidencia de la poliomielititis después de la introducción de la vacuna inactivada contra la polio (VIP) y la vacuna oral contra la polio (VOP). La gráfica muestra la disminución en la incidencia de la poliomielititis a partir de la introducción de la VIP en 1955 y la introducción de la VOP en 1962. Los casos fueron registrados de 1951 a 1979 por cada 100 000 personas en la población estadounidense (Minor 1999).

Ambas vacunas son trivalentes, contienen una cepa silvestre representativa de cada uno de los tres serotipos de poliovirus: Mahoney para el tipo 1, MEF-1 para el tipo 2 y Saukett para el tipo 3 (Sabin et al., 1973). De esta manera, se favorece la generación de una respuesta inmune protectora de por vida en contra del poliovirus en los individuos vacunados.

Vacuna inactivada contra la polio.

La vacuna inactivada contra la polio (VIP) está compuesta por poliovirus inactivados con formaldehído que son administrados por vía subcutánea. Los poliovirus inactivados (antígeno C) son virus cuya estructura antigénica nativa (antígeno D) ha sido modificada parcialmente con formaldehído (Martín et al., 2003). Los poliovirus inactivados ingresan al torrente sanguíneo del individuo y éste genera anticuerpos neutralizantes circulantes en contra del poliovirus. Cuando un individuo vacunado con la VIP es infectado con poliovirus silvestre, los anticuerpos circulantes previamente generados en contra del poliovirus inactivado neutralizan al poliovirus silvestre y evitan que entre al SNC. Sin embargo, los anticuerpos circulantes no neutralizan al poliovirus presente en el tracto gastrointestinal, por lo que los virus son excretados al ambiente (Buisman 2000).

Vacuna atenuada contra la polio.

La vacuna atenuada contra la polio, mejor conocida como vacuna oral contra la polio (VOP), consiste en poliovirus atenuados por pases consecutivos en cultivos celulares (Sabin et al., 1973). Los poliovirus atenuados son virus con mutaciones en la región no traducida del extremo 5' del genoma viral y en las proteínas de la cápside. Las mutaciones alteran la estabilidad de los IRES y por lo tanto, alteran la eficiencia de traducción del ARN mensajero viral (Minor 1992) (Tabla 2).

Tabla 2. Mutaciones de poliovirus atenuados utilizados en lavacuna oral contra la polio (VOP).

| Virus | Mutaciones (localización/ nucleótido) |
|-------------------|--|
| Poliovirus tipo 1 | 5' RNT (480) VP1 (1106, 1134) VP3 (3225) VP4 (4065) |
| Poliovirus tipo 2 | 5' RNT (481) VP1 (1143) |
| Poliovirus tipo 3 | 5' RNT (472) VP3 (3091) |

Flint et al., 2000

Los poliovirus atenuados de la VOP ingresan al individuo por vía oral y se replican en el tracto gastrointestinal del individuo vacunado. Los poliovirus generados por la replicación de los poliovirus de la VOP reciben el nombre de poliovirus atenuados derivados de la VOP (PVDV). Éstos son excretados de uno a dos meses después de la vacunación (Alexander et al., 1997). Los PVDV excretados infectan a otros individuos, quienes generan una respuesta inmune protectora en contra del poliovirus. De esta manera, la VOP vacuna indirectamente a otros individuos que no están vacunados.

El individuo vacunado genera una respuesta inmune protectora que consiste en anticuerpos neutralizantes circulantes y secretores en contra del poliovirus. Cuando un individuo vacunado con la VOP es infectado con poliovirus silvestre, los anticuerpos circulantes, localizados en el suero, neutralizan al poliovirus presente en el torrente sanguíneo y evitan que entre al SNC. Los anticuerpos secretores, localizados en las mucosas gastrointestinales, neutralizan al poliovirus presente en el tracto gastrointestinal y evitan que el virus sea excretado al ambiente (WHO 1993). Además, los PVDV compiten contra los poliovirus silvestres presentes en el tracto gastrointestinal del individuo vacunado (Alexander et al., 1997).

Los poliovirus atenuados no producen parálisis, sin embargo, algunos individuos desarrollan poliomiелitis parálitica asociada a la VOP (PPAV). El riesgo de PPAV es muy bajo, ocurre con una frecuencia de un caso en 2.5×10^6 primeras dosis de la VOP (Strebel et al., 1992). No obstante, la VOP no debe ser administrada a individuos inmunocomprometidos ya que pueden desarrollar poliomiелitis parálitica (Chitsike et al., 1999).

IV. Erradicación.

En 1988 la Organización Mundial de la Salud (OMS) decidió erradicar la poliomielitis para el año 2000. La erradicación consiste en eliminar al poliovirus y en detener la incidencia de la polio mediante una campaña mundial de vacunación con la VOP. El programa de vacunación consiste en una dosis de la VOP a los 3, 5 y 7 meses de edad y una dosis de refuerzo a los 4 ó 6 años de edad durante los días nacionales de inmunización.

Actualmente, la polio ha sido erradicada en el continente americano, en el continente europeo y en la región oriental del continente asiático. No obstante, el poliovirus silvestre aún circula en algunos países de África y Asia (WHO 2003). Hoy en día, la OMS ha cambiado la fecha de erradicación de la polio al año 2005 debido a problemas en el presupuesto, en la eficacia de las campañas de vacunación y a un nuevo problema, los poliovirus derivados de la VOP (PVDV).

V. Poliovirus derivados de la vacuna oral contra la polio.

La frecuencia de mutación del poliovirus es alta, es $\sim 10^{-4}$ mutaciones por par de bases por ciclo replicativo (Wells et al., 2001). Los poliovirus atenuados de la VOP se replican en el tracto gastrointestinal de los individuos vacunados y generan PVDV. Éstos mutan rápidamente y tienden a eliminar las mutaciones responsables de la atenuación (Minor et al., 1988). Los PVDV divergen $\geq 1\%$ en la secuencia de la proteína VP1 de las cepas atenuadas. Los PVDV se dividen en dos grupos que se describen a continuación (Martin et al., 2000).

El primer grupo consiste en PVDV provenientes de individuos inmunocomprometidos (PVDVi). Los PVDVi consisten en PVDV que se replican durante largos periodos en individuos inmunocomprometidos. La ausencia de una respuesta inmune y los largos periodos de replicación, hasta por 10 años, favorecen la acumulación de mutaciones y la reversión del poliovirus a formas neurovirulentas (Kew et al., 1998, Yoneyama et al., 2001). Actualmente no existe evidencia de la transmisión de PVDVi al resto de la población (Wood et al., 2000).

El segundo grupo consiste en PVDV circulantes (PVDVc). Los PVDVc circulan durante largos periodos, desde 1 hasta 10 años, en poblaciones donde la inmunidad contra el poliovirus es deficiente (Kew et al., 2004). La inmunidad deficiente y el uso inadecuado de la VOP favorecen la generación y la circulación de los PVDVc. En la actualidad, se han reportado epidemias de poliomielitis parálitica ocasionadas por la VOP.

Epidemias causadas por PVDVc.

Los PVDV adquieren dos características importantes durante su evolución en el tracto gastrointestinal de los individuos vacunados: la capacidad de causar parálisis y la capacidad de transmitirse. Lo anterior se conoce desde la creación de la VOP (Minor 1999), sin embargo, no había ocasionado problemas hasta recientemente. Anteriormente, se creía que todas las epidemias de poliomielitis parálítica eran causadas por poliovirus silvestres. No obstante, en los últimos años se han reportado epidemias de poliomielitis parálítica causadas por los PVDVc (Tabla 3).

Tabla 3. Epidemias causadas por PVDVc recombinantes.

| Pais | Número de casos de poliomielitis parálítica | Población vacunada | Serotipo viral | Divergencia con VP1 ¹ | Duración |
|------------------------------|---|--------------------|----------------|----------------------------------|-----------|
| Madagascar | 4 | < 50% | 2 | ~ 2% | 2001-2002 |
| Filipinas | 2 | ~ 80% | 1 | ~ 3% | 2001 |
| Haití y República Dominicana | 21 | ~ 30% | 1 | ~ 2% | 2000-2001 |
| China | 26 | No hay datos. | 2 | ~ 1% | 1997-2001 |
| Egipto | 30 | No hay datos. | 2 | ~ 3% | 1988-1993 |

¹ Divergencia en la secuencia de VP1 de los PVDVc con VP1 de las cepas atenuadas.

El factor crítico en las epidemias causadas por PVDVc es la falta de inmunidad de la población en contra del poliovirus, ya sea por la falta de inmunización con la VOP o por la eliminación previa del poliovirus silvestre. Todas las epidemias han sido causadas por PVDVc recombinantes. En una infección por poliovirus, aproximadamente del 10% al 20% de los genomas virales de los distintos serotipos de poliovirus recombinan entre si (Jarvis et al., 1992, Howley et al., 2001). Sin embargo, se ha reportado que el poliovirus también recombina con otros enterovirus presentes en el tracto gastrointestinal de los individuos vacunados. Algunos individuos están infectados con otros enterovirus al momento de recibir la VOP, por lo tanto, los PVDVc generados recombinan con los enterovirus presentes en el tracto gastrointestinal. La recombinación es un mecanismo que le permite a los PVDVc adquirir varios cambios rápidamente mediante el intercambio de partes del genoma viral, por ejemplo, la eliminación de las mutaciones atenuantes. No obstante, la recombinación no es un evento obligatorio en la reversión de los PVDVc a formas neurovirulentas.

La primera epidemia reportada que fue causada por PVDVc ocurrió en Haití y República Dominicana. El PVDVc responsable de la epidemia evolucionó rápidamente y generó dos cepas distintas de PVDVc. Ambas cepas contenían mutaciones responsables de la reversión del poliovirus a la forma neurovirulenta. Además, el extremo 3' provenía de otros enterovirus (Kew et al., 2002). La inmunidad de la población contra el poliovirus silvestre tipo 1 era baja ya que éste había sido erradicado en la región desde 1994. Asimismo, el porcentaje de la población vacunada con la VOP en el área afectada era muy baja, ~30% (Kew et al., 2004).

A diferencia de la epidemia anterior, la epidemia en Filipinas ocurrió en una población donde el porcentaje de la población vacunada con la VOP era muy alto, ~80% (CDC 2002). Sin embargo, en los años anteriores a la epidemia, la inmunidad en contra del poliovirus había disminuido debido a escasez de la VOP. Lo anterior favoreció la generación del PVDVc que ocasionó la epidemia (Kew et al., 2004).

En Madagascar, los PVDVc que ocasionaron la epidemia fueron dos cepas distintas de PVDVc que surgieron independientemente en poblaciones donde la inmunidad en contra del poliovirus era baja (Kew et al., 2004). En este caso, el porcentaje de la población vacunada con la VOP del área afectada era baja, ~50% (Rousset et al., 2003).

En el caso de Egipto, el PVDVc responsable de la epidemia no sólo causó poliomielititis paralítica, sino que reemplazó al poliovirus silvestre endémico y circuló en la población por 10 años (Yang et al., 2003). Lo anterior demuestra que los PVDVc pueden circular indefinidamente en lugares donde la inmunidad en contra del poliovirus es constantemente baja (Kew et al., 2004).

Actualmente, el número de epidemias causadas por PVDVc continúa en aumento. La última epidemia reportada ocurrió en China (Chiba et al., 2003). También, estudios retrospectivos han demostrado que los PVDVc han ocasionado epidemias en el pasado. Antes, éstas habían sido atribuidas a poliovirus silvestres, como fue el caso de Rusia, Egipto, Rumania, Bielorrusia, Finlandia y Polonia, pero el reciente análisis molecular de los poliovirus ha demostrado que los PVDVc fueron los responsables de las epidemias (Cherkasova et al., 2002, Yang et al., 2003, Georgescu et al., 1997, Korotkova et al., 2003, Hovi et al., 1986, Poyry et al., 1990, Martin et al., 2000) (Tabla 4).

Tabla 4. Epidemias posiblemente causadas por PVDVc.

| País | Número de casos de poliomiélitis paralítica | Serotipo viral | Duración |
|-------------|--|-----------------------|-----------------|
| Rusia | 1 | 1 | 1999 |
| Finlandia | 9 | 3 | 1984-1985 |
| Rumania | 6 | 1 | 1980 |
| Polonia | No hay datos | 3 | 1968 |
| Bielorusia | No hay datos | 2 | 1963-1966 |

Control de las epidemias.

En todas las epidemias causadas por PVDVc se han reportado casos de poliomiélitis paralítica en individuos que han recibido el esquema de vacunación completo de la VOP. Sin embargo, aún no se han llevado a cabo estudios para determinar a que se debe la falta de inmunidad en estos individuos. En parte, se ha demostrado que las propiedades antigénicas de los PVDVc son más parecidas a las de los poliovirus silvestres que a las cepas atenuadas de las que derivan (Kew et al., 2004). Lo anterior sugiere que las propiedades antigénicas de los PVDVc cambian durante su circulación y que la inmunidad conferida por la VOP no siempre es suficiente para proteger en contra de la parálisis causada por los PVDVc (Nomoto et al., 2002).

Las epidemias son controladas con la administración masiva de la VOP en períodos muy cortos, pero la estrategia anterior genera un círculo vicioso, como se describe a continuación. Los poliovirus atenuados de la VOP generan PVDV y éstos, en las condiciones adecuadas, pueden convertirse en PVDVc y así ocasionar, nuevamente, epidemias. Por lo tanto, es probable que la mayoría de los casos de polio, de ahora en adelante, estén asociados a PVDV, lo cual altera la relación riesgo-beneficio de la VOP (Kew et al., 2004).

Actualmente, la OMS ha replanteado la estrategia de erradicación de la polio y ha indicado que la administración de la VOP debe ser detenida inmediatamente después de la eliminación de los poliovirus silvestres (WHO 2003). No obstante, se han propuesto distintas estrategias a seguir para suspender el uso de la VOP.

La primera estrategia consiste en continuar vacunando con la VOP, pero incluyendo una dosis de la VOP al nacimiento en países donde la polio aún es endémica (WHO 2003). Sin embargo, el 100% de la población debe estar vacunada para evitar la generación de PVDVc. Asimismo, vacunar al 100% de la población es un objetivo difícil de alcanzar con las campañas de erradicación que existen actualmente.

La segunda propuesta consiste en vacunar con la VIP en regiones libres de polio. La OMS no favorece esta estrategia que consiste en utilizar la VIP para evitar la generación de PVDVc y para evitar los casos de PPAV. No obstante, la VIP no siempre confiere protección en contra de los PVDVc, como se observó en las epidemias de Finlandia (Hovi et al., 1986, Poyry et al., 1990) y de Polonia (Martín et al., 2003). Asimismo, el costo de producción y de administración de la VIP no es costeable para la mayoría de las naciones. No obstante, algunos países industrializados libres de polio utilizan únicamente la VIP. El programa de vacunación consiste en una dosis de la VIP a los 2, 4 y 6 meses de edad y una dosis de refuerzo a los 4 o 6 años de edad (WHO 2003).

La tercera propuesta consiste en mejorar la eficacia de la VIP y en la generación de nuevas estrategias de vacunación contra la poliomielititis. La mejora de la VIP consiste en reducir su costo y en incrementar la protección inducida en contra de los PVDV (Korotkova et al., 2003). La generación de nuevas estrategias de vacunación consiste en la generación de vacunas que no sean infecciosas, con el fin de eliminar la generación de PVDVc. Sin embargo, se han propuesto pocas alternativas y solamente una ha sido probada directamente con el poliovirus.

Una de las alternativas propuestas es una vacuna basada en bacterias entéricas no patogénicas que expresen proteínas virales. Las proteínas virales pueden estar codificadas en el ADN bacteriano y pueden ser expresadas en la superficie de la bacteria o pueden ser secretadas (Korotkova et al., 2003). Otra alternativa consiste en una vacuna basada en cápsides vacías de poliovirus (Ansardi et al., 1991 y Brautigam et al., 1993) o en procápsides. Las últimas consisten en el antígeno N de poliovirus (Rombaut et al., 1997). No obstante, los estudios solamente se han llevado a cabo *in vitro* utilizando como sistemas de expresión baculovirus recombinantes en células de insecto (Brautigam et al., 1993), virus de vaccinia recombinantes en células de mamífero (Ansardi et al., 1991) y *S. cerevisiae* (Rombaut et al., 1997). Solamente en el último caso se ha analizado la estructura antigénica de las partículas *in vitro*. Además, a pesar de que se examinó la generación de anticuerpos protectores en contra del antígeno N, no se analizó la capacidad protectora conferida por los proviriones *in vivo* (Rombaut et al., 1997).

VI. Vacunas de ADN.

Las vacunas de ADN consisten en un gen o genes que codifican un antígeno de interés clonados en un vector de expresión en células de mamífero. El vector de expresión es un

plásmido de ADN de doble cadena de origen bacteriano con las siguientes características: un origen de replicación para su replicación en bacterias, genes de resistencia a antibióticos para su selección en cultivos bacterianos, un sitio de clonación localizado río abajo del promotor eucariótico para la inserción de los genes de interés en el vector, un promotor eucariótico para la expresión de los genes clonados en células de mamífero y secuencias de poliadenilación para estabilizar los transcritos de ARN mensajero (Gurunathan et al., 2000).

Las vacunas de ADN permiten manipular fácilmente, mediante tecnología de ADN recombinante, los genes que codifican los antígenos de interés con el fin de crear vacunas más específicas y eficaces en contra de distintos patógenos. La inoculación de un vector de expresión que contiene un gen o genes que codifican un antígeno de interés recibe el nombre de vacunación o inmunización por ADN. Las vacunas de ADN son capaces de generar una respuesta inmune protectora en los individuos vacunados. Los plásmidos de origen bacteriano utilizados en las vacunas de ADN no generan por si solos una respuesta inmune en el hospedero, pero contienen islas CpG que ejercen un efecto adyuvante. Las vacunas de ADN también pueden generar una respuesta inmune adaptativa humoral y celular (Liu 2003) (Figura 4).

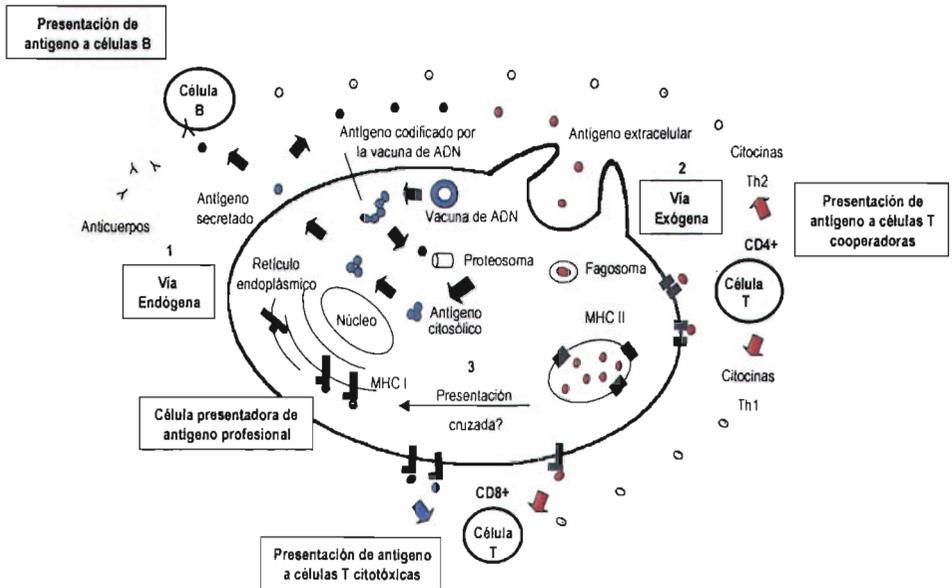


Figura 4. Mecanismos de generación de la respuesta inmune humoral y celular por las vacunas de ADN. Una célula presentadora de antígeno profesional es transfectada con la vacuna de ADN. (1) Dentro de la célula, el vector expresa los antígenos proteicos codificados y éstos son procesados por la vía endógena. Las proteínas son procesadas por el proteosoma en péptidos que se asocian con moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad I (MHC I) sintetizadas en el retículo endoplásmico. Los complejos MHC I-péptido son transportados a la superficie celular y son presentados, junto con moléculas coestimuladoras, a células T CD8+ citotóxicas. Éstas reconocen el antígeno presentado por el MHC I mediante el receptor de células T (TCR) y activan las funciones citotóxicas de la célula. Las proteínas expresadas en el interior de las células transfectadas son liberadas al medio extracelular y actúan como antígenos exógenos. Las células presentadoras de antígeno profesionales internalizan el antígeno exógeno y lo procesan por la vía exógena. La proteína es degradada por vía endolisosomal en péptidos que se asocian con el complejo mayor de histocompatibilidad clase II (MHC II). Los complejos MHC II-péptidos son transportados a la superficie celular y son presentados a células T CD4+ ayudadoras. Éstas reconocen el antígeno presentado por el MHC II mediante el TCR y producen distintas citocinas. Las citocinas tienen diversas funciones, favorecen la actividad citotóxica de las células T (Th1) o favorecen la respuesta inmune humoral (Th2). (2) Las células B también reconocen el antígeno liberado por las células presentadoras de antígeno mediante el receptor de células B (BCR). Las células B se activan y generan anticuerpos en contra del antígeno. (3) En algunos casos, los antígenos procesados por vía exógena son presentados en moléculas del MHC II. El proceso anterior recibe el nombre de presentación cruzada. De esta manera, se genera una respuesta citotóxica en contra de antígenos exógenos. Sin embargo, el proceso mediante el cual se lleva a cabo la presentación cruzada aún se desconoce.

A continuación, se describen las ventajas y desventajas de las vacunas de ADN sobre las vacunas atenuadas e inactivadas (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis comparativo de las vacunas de ADN, vacunas atenuadas y vacunas inactivadas.

| | Vacunas de ADN | Vacunas atenuadas | Vacunas inactivadas |
|--------------------------------|------------------------------|------------------------------|---------------------------------|
| Infección | Simulan la infección natural | Simulan la infección natural | No simulan la infección natural |
| Conformación antigénica | Nativa | Nativa | No nativa |
| Reversión | Imposible | Posible | Imposible |
| Respuesta inmune | | | |
| Humoral | Células B | +++ | +++ |
| | CD4+ | +++ Th1, Th2 ^a | +/- Th1 |
| Celular | CD8+ | ++ | +++ |
| | Presentación de antígeno | MHC clase I y II | MHC clase I y II |
| Memoria inmune | | | |
| | Humoral | +++ | +++ |
| | Celular | ++ | +++ |
| | Seguridad | +++ ^b | ++ ^c |

^a Respuesta Th1 o Th2 inducida dependiendo de la vía de administración.
^b Información obtenida de estudios clínicos fase I.
^c En las condiciones adecuadas pueden revertir a la forma virulenta.

Modificado de Gurnathan et al., 2000

Al igual que las vacunas atenuadas y a diferencia de las vacunas inactivadas, las vacunas de ADN simulan una infección natural ya que producen y procesan los antígenos activamente. El procesamiento activo de los antígenos favorece la generación de una respuesta inmune humoral y celular. En cambio, en las vacunas inactivadas, los antígenos no son procesados activamente, por lo que solamente se favorece la generación de una respuesta inmune humoral. Al igual que las vacunas atenuadas, los antígenos codificados en las vacunas de ADN normalmente se expresan en su conformación nativa. En cambio, el proceso utilizado para inactivar al patógeno durante la generación de las vacunas inactivadas, altera su conformación antigénica nativa. Al igual que las vacunas inactivadas y a diferencia de las vacunas atenuadas, las vacunas de ADN son estables y no son infecciosas, por lo tanto no presentan el riesgo de reversión a la forma virulenta del patógeno. Al igual que las vacunas atenuadas e inactivadas, las vacunas de ADN tienen una vida media que permite la generación de una memoria inmunológica. También, los avances en la

administración de las vacunas de ADN han permitido modificar y dirigir la respuesta inmune del individuo vacunado de acuerdo al tipo de respuesta inmune requerida (Gurunathan et al., 2000).

Las vacunas de ADN presentan algunos riesgos como la integración de los genes de la vacuna de ADN al genoma del individuo vacunado, la generación de autoinmunidad y la generación de estados de tolerancia. La probabilidad de que los eventos anteriores sucedan es extremadamente baja y no se ha reportado que ocurran en individuos vacunados (Liu 2003).

En este estudio se utilizó el plásmido pVax 1 en la construcción de las vacunas de ADN contra la poliomielitis. Éste es un vector de expresión en eucariontes que fue diseñado para ser utilizado en el desarrollo de vacunas de ADN (FDA 1996). pVax 1 fue construido a partir del vector pc DNA 3, pero con las siguientes modificaciones. Las secuencias innecesarias para la replicación del plásmido en *E. coli* y para la expresión de proteínas recombinantes en células eucariontes fueron eliminadas. De esta manera, se redujo el número de secuencias en el plásmido con posible homología en el genoma humano, por lo tanto, la posibilidad de integración cromosomal es mínima. También, el gen de resistencia a ampicilina fue sustituido por el gen de resistencia a kanamicina con el fin de disminuir la probabilidad de reacciones alérgicas en humanos.

VII. Modelos animales.

Los humanos y los monos son los únicos reservorios naturales del poliovirus. Ambos son susceptibles a la polio porque expresan el receptor de poliovirus, la molécula CD155, en la superficie de determinados tipos celulares (Ren et al., 1990).

Distintos primates no humanos como los monos rhesus y los chimpancés han sido utilizados como modelo para el estudio de la polio durante décadas (Sabin et al., 1973, Dragunsky et al., 2003). Sin embargo, existen diferencias entre la patología de la polio en humanos y en primates no humanos. La principal diferencia radica en las vías de infección del poliovirus. En primates no humanos, la principal vía de infección es la vía intranasal. A pesar de que la polio puede ser inducida en humanos por la vía anterior, esto no ocurre naturalmente (Minor 1999). En humanos, la principal vía de infección es la vía oral mediante la cual el poliovirus ingresa al individuo por material contaminado. Los primates no humanos son susceptibles a la polio por vía oral, pero requieren dosis muy grandes de poliovirus para desarrollar la enfermedad. Otras vías de infección

utilizadas en el modelo primate no humano son la vía intraespinal, intramuscular, intranasal, intraperitoneal e intravenosa (Nagata et al., 2004).

Por razones éticas, económicas y prácticas se ha buscado otra especie para ser utilizada como modelo de la polio. Actualmente, existe un modelo murino que consiste en ratones transgénicos para el receptor humano de poliovirus (PVR): TgPVR (Ren et al., 1990). Los ratones transgénicos expresan las cuatro isoformas del receptor humano de poliovirus en distintas cantidades bajo el promotor humano de poliovirus (Crotty et al., 2002).

El modelo murino TgPVR ha sido aprobado recientemente por la OMS como modelo para estudios de neurovirulencia en el control de las vacunas contra la polio (Dragunsky et al., 2003). No obstante, los primates no humanos continúan siendo el modelo de la polio por excelencia. Las vías de infección de los ratones transgénicos y de los primates no humanos son muy semejantes. También, los síntomas clínicos desarrollados por los ratones transgénicos infectados son similares a los manifestados por primates no humanos. Al igual que los humanos y los primates no humanos, los ratones transgénicos infectados por poliovirus pueden desarrollar parálisis y/o muerte. Sin embargo, los ratones transgénicos tardan menos tiempo que los primates no humanos en manifestar síntomas característicos de la polio (Ren et al., 1990). El modelo murino se basa en la presencia o ausencia de parálisis, a diferencia del modelo de primates no humanos que se basa en el análisis histopatológico del cerebro (Dragunsky et al., 2003). Finalmente, los ratones transgénicos infectados desarrollan una respuesta inmune protectora en contra del poliovirus similar a la humana, al igual que los primates no humanos (Buisman et al., 2000).

En la actualidad existen diversas cepas de ratones transgénicos para el receptor humano de poliovirus derivadas de la cepa TgPVR. Las diferencias entre las cepas radican en los promotores que controlan la expresión del receptor humano de poliovirus y en los tipos de células que expresan el receptor humano de poliovirus (Deatly et al., 1998).

El receptor humano de poliovirus es el principal determinante del tropismo celular, sin embargo, sólo constituye una parte en la patogénesis de la polio, ya que su expresión es necesaria, pero no es suficiente para inducir una infección productiva (Zhang et al., 1997). El receptor humano de poliovirus se expresa principalmente en cerebro, médula espinal, músculo y pulmón (Ren et al., 1990, Nagata et al., 2004) y en algunos casos en el epitelio intestinal de los ratones transgénicos (Zhang et al., 1997).

Las cepas transgénicas son susceptibles a la infección por poliovirus por vía intracerebral, intraespinal, intramuscular, intranasal, intraperitoneal e intravenosa (Ren et al., 1990, Deatly et al., 1998, Buisman et al., 2000, Nagata et al., 2004). Ninguna de las cepas es susceptible a la infección por vía oral.

Lo anterior constituye una desventaja para el modelo murino ya que la vía de infección natural del poliovirus es la vía oral. Existen tres teorías que explican porque los ratones transgénicos para el receptor humano de poliovirus son resistentes a la infección por vía oral. La primera sugiere que existen diferencias en la superficie apical del intestino de humanos y de ratones que controlan el que el poliovirus atraviese o no el epitelio intestinal. La segunda sugiere que el receptor humano de poliovirus en el modelo murino no sufre las modificaciones post traduccionales necesarias para que el poliovirus infecte las células del epitelio gastrointestinal. La tercera sugiere que existen factores celulares en el modelo murino que no favorecen o impiden la infección por poliovirus (Zhang et al., 1997, Crotty et al., 2002).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que los poliovirus atenuados de la vacuna oral contra la polio (VOP) se replican en el tracto gastrointestinal de los individuos vacunados y generan poliovirus derivados de la VOP (PVDV). En las condiciones adecuadas, los PVDV adquieren la capacidad de transmitirse y de causar parálisis. Algunos PVDV circulan durante largos períodos en poblaciones donde la inmunidad contra el poliovirus es deficiente, por lo que generan PVDV circulantes (PVDVc) que pueden causar epidemias de poliomielitis paralítica.

Las epidemias de PVDVc son controladas con la administración masiva de VOP, pero esto genera un círculo vicioso ya que los poliovirus atenuados de la VOP son los que generan PVDV y éstos se convierten en PVDVc que ocasionan, nuevamente, epidemias. También, en todas las epidemias se han reportado casos de poliomielitis paralítica en individuos que han recibido el esquema completo de vacunación. A pesar de que no se han llevado a cabo estudios para determinar la causa de esta falta de inmunidad, se ha sugerido que las propiedades antigénicas de los PVDVc cambian durante su circulación y de esta manera la inmunidad conferida por la VOP no siempre es suficiente para proteger en contra de los PVDVc.

Con base al número creciente de epidemias ocasionadas por PVDVc, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que en un futuro cercano la mayoría de los casos de poliomielitis podrían estar asociados al uso de la VOP. Lo anterior altera de manera dramática la relación riesgo-beneficio de la VOP. Por lo tanto, es necesario detener la generación de PVDVc y proteger a la población en contra de éstos. Para este propósito, se busca una alternativa efectiva, segura y de bajo costo.

En este trabajo se propone el diseño y prueba de una vacuna de ADN contra el poliovirus. Al igual que la VOP, una vacuna de ADN, podría generar una respuesta inmune protectora en contra del poliovirus. De esta manera, la respuesta inmune inducida por la vacuna de ADN evitaría la transmisión de los PVDVc y del poliovirus silvestre. A diferencia de la VOP, una vacuna de ADN sería estable y no podría revertir a la forma neurovirulenta del virus. Como la vacuna de ADN en contra del poliovirus no estaría compuesta por poliovirus, la generación de PVDVc sería imposible. Además, sería una alternativa para los individuos inmunocomprometidos, ya que éstos no pueden ser vacunados con la VOP. Consecuentemente, la construcción y prueba de una vacuna de ADN en contra del poliovirus constituye una nueva alternativa en contra de la poliomielitis.

El efecto de las vacunas se basa en la estimulación de una respuesta inmune y en la generación de una memoria inmunológica, ambas en contra de un antígeno específico. Así, la subsiguiente exposición al antígeno, en distintas condiciones, estimula una respuesta inmune protectora. No obstante, el proceso de desarrollo de nuevas vacunas es un proceso largo y complejo que consta de dos fases. La primera, llamada fase pre clínica, consiste en la construcción y en la prueba de la vacuna tanto en modelos *in vitro* como *in vivo*. La segunda, llamada fase clínica consiste, en la prueba de la vacuna en voluntarios humanos.

En este trabajo, los estudios consisten en explorar de manera general la respuesta protectora inducida por una vacuna de ADN en contra del poliovirus. Por lo tanto, este estudio solamente se enfoca a las primeras etapas de la fase pre clínica que consisten en la construcción adecuada y en el análisis de la capacidad protectora de las vacunas.

OBJETIVOS

Objetivos Generales.

- Construir dos vacunas de ADN que contengan los genes que codifican para las proteínas de la cápside de poliovirus silvestre tipo I. La primera consistirá en un plásmido con los cuatro genes que codifican las proteínas de la cápside de poliovirus silvestre tipo I. La segunda consistirá en un cocktail de cuatro plásmidos, donde cada plásmido tendrá uno de los genes que codifican las proteínas de la cápside de poliovirus silvestre tipo I.
- Evaluar si las vacunas de ADN construidas confieren protección en contra del poliovirus silvestre tipo I en un modelo murino.

Objetivos Específicos.

1. Clonar los cuatro genes que codifican las proteínas de la cápside de poliovirus silvestre tipo I, juntos y por separado, en un vector de origen bacteriano adecuado para su uso como vacuna de ADN.
2. Comprobar la construcción adecuada de las vacunas mediante PCR y secuenciación de ADN.
3. Evaluar la expresión de las proteínas codificadas por los genes contenidos en cada una de las construcciones.
4. Vacunar ratones susceptibles a la infección por poliovirus con las vacunas de ADN construidas.
5. Retar a los ratones vacunados con poliovirus silvestre tipo I.
6. Evaluar la supervivencia de los ratones retados.
7. Evaluar la capacidad de las vacunas de ADN de generar anticuerpos protectores en contra del poliovirus silvestre tipo I.

HIPÓTESIS

Una vacuna de ADN en contra de la poliomiелitis que consista en los genes que codifican para cada una de las proteínas de la cápside de poliovirus silvestre tipo I, induce una respuesta inmune que protege en contra de una infección por poliovirus silvestre tipo I.

MATERIALES y MÉTODOS

Plásmidos.

El plásmido pVax 1 fue obtenido de Invitrogen (Invitrogen Life Technologies). El plásmido pGFP-C1 fue obtenido de Clontech (BD Biosciences Clontech). Los plásmidos pMov 2.11 y pXpA fueron donados por el Dr. Raúl Andino, Departamento de Inmunología y Microbiología, Universidad de California San Francisco (UCSF), USA. El plásmido pXpA contiene el ADNc de poliovirus silvestre tipo 1 de la cepa Mahoney.

Virus.

El poliovirus silvestre tipo I de la cepa Mahoney fue donado por el Dr. Raúl Andino, UCSF. Los poliovirus atenuados tipo I, II y III fueron obtenidos de la vacuna oral antipoliomielítica fabricada por Laboratorios Birmex S. A. de C. V. La vacuna antipoliomielítica contiene los siguientes títulos de los distintos serotipos de poliovirus humanos: 1×10^6 TCID₅₀ del tipo I, 1×10^5 TCID₅₀ del tipo II y 6×10^5 TCID₅₀ del tipo III.

Células.

Todos los experimentos se realizaron en células HeLa (ATCC CCL-2). Las células fueron crecidas y mantenidas en Medio Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (In vitro S. A. de C. V.) complementado con 5% o con 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco BRL, Life Technologies) y 0.5% de antibióticos (10,000 U/ μ g/ml de mezcla de penicilina-estreptomina en solución salina de NaCl al 0.85%) (In vitro). Las células fueron crecidas a 37°C en una atmósfera con 95% O₂ y 5% CO₂. Cuando las monocapas celulares alcanzaron el 90% de confluencia fueron subcultivadas utilizando tripsina al 0.75% (Gibco BRL) en PBS.

Sueros y anticuerpos.

El suero humano que contiene anticuerpos policlonales en contra de los tres serotipos de poliovirus atenuados y en contra de los tres serotipos de poliovirus inactivados, fue donado por un individuo que había recibido cuatro dosis de la vacuna oral contra la polio y una dosis de la vacuna inactivada contra la polio (Dra. María del Carmen Rodríguez, Centro Médico Nacional Siglo XXI,

México). El suero de conejo en contra del poliovirus silvestre tipo 1 de la cepa Mahoney fue donado por el Dr. Raúl Andino, UCSF.

El suero anti-IgM, IgG e IgA humanas fue obtenido de Zymed (Zymed Laboratories Inc.). El anticuerpo secundario anti-IgG de conejo fue obtenido de Amersham (Amersham Biosciences). El anticuerpo secundario anti-IgG de ratón fue obtenido de Zymed.

Animales.

La cepa murina cPVR, fue donada por el Dr. Raúl Andino, UCSF. La cepa cPVR consiste en ratones transgénicos para el receptor de poliovirus humano que son susceptibles a la infección por poliovirus. Ratones de 6 a 8 semanas de edad fueron utilizados en los experimentos. Los ratones fueron mantenidos en cajas de microaislamiento con comida y agua *ad libitum*.

Extracción y purificación del ADN plasmídico.

Los plásmidos fueron propagados en la cepa JM101 de *E. coli* en medio Luria Bertrani (LB, 1% triptona (w/v), 0.5% extracto de levadura (w/v), 1% NaCl (w/v), 4 mM NaOH). Los cultivos fueron incubados a 37°C con agitación durante 16 horas. Los plásmidos pXpA y pMov 2.11 fueron propagados en presencia de ampicilina a una concentración final de 100 µg/ml y los plásmidos pVax 1 y pGFP-C1 fueron propagados en presencia de kanamicina a una concentración final de 50 µg/ml.

El ADN plasmidico fue extraído mediante lisis alcalina a pequeña escala de acuerdo al método de Sambrook et al. (1989), con algunas modificaciones. Brevemente, 5 ml de cultivo fueron centrifugados en tubos tipo Eppendorf, durante cinco minutos a 500 x g. El botón celular obtenido fue resuspendido en 200 µl de solución de glucosa [50 mM glucosa, 25 mM Tris-Cl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8), 10 mg/ml lisozima]. 200 µl de 0.2 N NaOH, 1% SDS (w/v) fueron añadidos y los tubos fueron invertidos. Las muestras fueron incubadas durante cinco minutos a 4°C y 300 µl de 3 M de acetato de potasio (CH₃COOK) (pH 4.8) fueron añadidos. Los tubos fueron invertidos e incubados durante 10 minutos a 4°C. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 x g durante cinco minutos. Posteriormente, el sobrenadante resultante fue transferido a tubos tipo Eppendorf limpios y 500 µl de isopropanol fueron añadidos. Las muestras fueron incubadas durante 10 minutos a 4°C y después fueron centrifugadas a 1000 x g durante cinco minutos. El sobrenadante resultante fue decantado y los pellets fueron resuspendidos en 200 µl de buffer Tris-EDTA [10 mM Tris-HCl

(pH 7.6), 1 mM EDTA (pH 8)]. Se añadieron 100 μ l de 7.5 M de acetato de amonio ($\text{CH}_3\text{COONH}_4$) a los tubos que contenían las muestras. Éstos se invirtieron, se incubaron durante 20 minutos a 4°C y se centrifugaron a 1000 x g durante cinco minutos. El sobrenadante resultante fue transferido a tubos tipo Eppendorf limpios. Después, un volumen de etanol al 70% frío, fue añadido y las muestras fueron incubadas durante una hora a -70°C. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 1000 x g durante 10 minutos, el sobrenadante fue decantado y el pellet fue resuspendido en 20 μ l de agua ultra pura (Gibco BRL).

Posteriormente, el ADN plasmídico obtenido fue purificado por extracción con fenol-cloroformo según el método de Sambrook et al. (1989) con algunas modificaciones. El volumen total de la muestra fue igualado con solución de fenol saturado y cloroformo en proporción 1 a 1, respectivamente. Las muestras fueron mezcladas en el vórtex durante 15 segundos y fueron centrifugadas a 1000 x g durante cinco minutos. Se formaron dos fases, una acuosa y una densa, la primera fue transferida a tubos tipo Eppendorf limpios. Después, se agregó un volumen de solución alcohol isoamílico y cloroformo en proporción 24 a 1, respectivamente. Las muestras fueron centrifugadas a 1000 x g durante 10 segundos. Nuevamente, se formaron dos fases, pero solamente la fase acuosa fue transferida a tubos tipo Eppendorf limpios. Se agregaron tres volúmenes de etanol al 70% y 0.05 volúmenes de 4 M NaCl. Las muestras fueron incubadas durante una hora a -70°C. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 1000 x g durante 15 minutos a 4°C y la pastilla fue resuspendida en 20 μ l de agua ultra pura.

Las concentraciones de ADN plasmídico purificado fueron determinadas por espectrofotometría (A_{260}/A_{280}). El ADN plasmídico fue analizado por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 80 V durante 45 minutos y fue visualizado por tinción con bromuro de etidio en un transiluminador de rayos ultravioleta.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Los genes que codifican las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4 de la cápside de poliovirus silvestre tipo I fueron amplificados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el plásmido pXpA como molde. Los oligonucleótidos fueron diseñados de tal manera para que introdujeran un sitio de restricción *Eco*RI (Roche Diagnostics GmbH) en el extremo 5' y un sitio de restricción *Xho*I (Roche Diagnostics GmbH) en el extremo 3'. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Gibco BRL y fueron utilizados como cebadores:

| | |
|-------|--------------------------------|
| VP1-F | 5' CGAATTCATGGGGTTAGGTCAG 3' |
| VP1-R | 5' CCTCGAGGTGTCCGAATCCATA 3' |
| VP2-F | 5' CGAATTCGCCCAATGCTAAAC 3' |
| VP2-R | 5' CCTCGAGGCCCTGTAAGCGTGG 3' |
| VP3-F | 5' CGAATTCATGCCACGCTTACAGGG 3' |
| VP3-R | 5' CCTCGAGCTGTGCTAGCGCTTT 3' |
| VP4-F | 5' CGAATTCATGGGTGCTCAGGTT 3' |
| VP4-R | 5' CCTCGAGGTTTAGCATTGGGGC 3' |

Los genes que codifican las proteínas de la cápside fueron amplificados individualmente utilizando los siguientes pares de oligonucleótidos: VP1-F y VP1-R para VP1 (producto de 917 pb), VP2-F y VP2-R para VP2 (producto de 833 pb), VP3-F y VP3-R para VP3 (producto de 725 pb) y VP4-F y VP4-R para VP4 (producto de 206 pb). Los genes que codifican las proteínas de la cápside fueron amplificados en conjunto utilizando los oligonucleótidos VP4-F y VP1-R (producto de 2642 pb) . Éstos fueron utilizados ya que los cuatro genes se encuentran en el siguiente orden en el plásmido pXpA que contiene el ADNc de poliovirus silvestre tipo 1 de la cepa Mahoney: VP4-VP2-VP3-VP1.

El proceso de amplificación se llevó a cabo en un termociclador GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) con el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por cinco minutos, 30 ciclos que consistieron en desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 40°C por 60 segundos y extensión a 72°C por 90 segundos y un ciclo final a 72°C por 10 minutos.

El gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) fue amplificado por PCR utilizando el plásmido pMov 2.11 como templado. Los oligonucleótidos fueron donados por el Dr. Raúl Andino, UCSF y fueron diseñados de tal manera para que introdujeran un sitio de restricción *Xho*I en el extremo 5' y un sitio de restricción *Xba*I en el extremo 3'. Los oligonucleótidos fueron sintetizados y fueron utilizados como cebadores:

| | |
|-------|---|
| GFP-F | 5' TTATGAGCTCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG 3' |
| GFP-R | 5' TCATTCTAGACCTCGAGCTTGTACAGCTCGTCC 3' |

El proceso de amplificación del gen que codifica la proteína verde fluorescente (producto de 720 pb) se llevó a cabo con el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización a 94°C por cinco minutos, 30 ciclos que consistieron en desnaturalización a 95°C por 30 segundos, alineación a 65°C por 60 segundos y extensión a 72°C por 90 segundos y un ciclo final a 72°C por 10 minutos.

Los productos de PCR (producto) fueron purificados por extracción con fenol-cloroformo y luego fueron precipitados. Posteriormente, los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8% a 80 V durante 45 minutos y fueron visualizados por tinción con bromuro de etidio en un transiluminador de rayos ultravioleta.

Construcción de las vacunas de ADN.

La construcción de las vacunas de ADN se llevó a cabo mediante la clonación de los genes que codifican las proteínas de la cápside de poliovirus silvestre tipo I en el vector pVax 1. El proceso de clonación se describe a continuación.

Primero, el plásmido pVax 1 y los cinco productos de PCR fueron digeridos con las endonucleasas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. Brevemente, 5 µg de ADN plasmídico fueron incubados con cinco unidades de las enzimas respectivas a 37°C durante una hora. El volumen total de reacción fue llevado a 20 µl con agua ultra pura. Finalmente, el ADN plasmídico cortado fue purificado por extracción fenol-cloroformo.

Los genes que codifican las proteínas VP1, VP2, VP3, VP4 y VP4-1, amplificados por PCR y purificados por extracción fenol-cloroformo, fueron ligados río abajo del promotor de CMV en el vector pVax 1 cortado. Se llevaron a cabo cuatro reacciones de ligación, una para cada uno de los genes que codifican las proteínas VP1, VP2, VP3, VP4 y VP4-1. Brevemente, 300 ng de los genes fueron incubados con 100 ng de ADN plasmídico en presencia de 2 µl de T4 DNA ligasa (0.1 unidades/µl) (Invitrogen Life Technologies) y 4 µl de buffer de ligación 5x. El volumen total de reacción fue llevado a 20 µl con agua ultra pura. La reacción fue incubada a 23° C durante 12 horas. Los siguientes plásmidos fueron obtenidos: pVax 1-VP4-1, pVax 1-VP1, pVax 1-VP2, pVax 1-VP3 y pVax 1-VP4.

Después, la cepa JM109 de *E. coli* fue transformada con los plásmidos anteriores mediante choque térmico, de acuerdo a Ausubel (1998). Brevemente, 100 µl de bacterias JM109

competentes fueron incubadas con 5 μ l de reacción de ligación durante 15 minutos a 4°C. Las bacterias fueron sometidas a choque térmico a 42°C durante dos minutos. Luego, se añadieron 500 μ l de LB a cada reacción y las bacterias transformadas fueron incubadas durante una hora a 37°C con agitación. Finalmente, las muestras fueron centrifugadas a 500 x g durante tres minutos, resuspendidas en 100 μ l de LB y sembradas en cajas de LB con kanamicina (50 μ g/ml).

Finalmente, se extrajo el ADN plasmídico de las colonias resultantes. La presencia de los genes que codifican las proteínas virales en cada uno de los plásmidos construidos, fue detectada por PCR y por cortes con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*. Una vez que la presencia de los genes que codifican las proteínas de la cápside en los plásmidos respectivos fue comprobada, se realizaron cultivos de colección en glicerol. Brevemente, 850 μ l de cultivo fueron adicionados a 100 μ l de glicerol contenidos en criotubos.

Los plásmidos obtenidos fueron designados pVP4-1, pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4, respectivamente. Los plásmidos construidos fueron clasificados en dos vacunas de ADN: la primera vacuna de ADN contra el poliovirus (vADN1-PV) consistió en el plásmido pVP4-1 y la segunda vacuna de ADN contra el poliovirus (vADN2-PV) consistió en los plásmidos pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4.

Secuenciación.

La secuencia de los genes contenidos en los plásmidos pVP4-1, pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4 fue comprobada usando dideoxiterminales. La secuenciación se llevó a cabo por M. en C. Patricia de la Torre, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) utilizando el secuenciador automático de electroforesis capilar ABI Prism 310 Genetic Analyzer PE (Applied Biosystems).

Cultivo de colección de poliovirus silvestre tipo I.

La cepa Mahoney de poliovirus silvestre tipo 1 fue propagada en células HeLa de acuerdo al método de Minor (1987). Brevemente, monocapas celulares al 80% de confluencia con 5×10^6 células fueron lavadas una vez con PBS [0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.14% Na₂HPO₄, 0.02% KH₂PO₄ (pH 7.4)] y fueron inoculadas con 100 μ l de poliovirus de poliovirus silvestre tipo I en DMEM sin complementar. Los cultivos se mantuvieron durante 48 horas, como se describió anteriormente. Después, el sobrenadante y las células fueron congelados y descongelados tres veces utilizando

hielo seco-etanol y baños de agua a 37°C. Finalmente, el sobrenadante y las células fueron recolectados y fueron centrifugados a 3000 x g durante cinco minutos. El sobrenadante fue transferido a tubos y fue guardado a -20°C.

Titulación del cultivo de colección de poliovirus silvestre tipo I.

El título de virus en el stock de poliovirus silvestre tipo I fue determinado mediante ensayos de formación de placa. Monocapas celulares al 80% de confluencia crecidas en placas de seis pozos fueron lavadas dos veces con PBS. Posteriormente, se prepararon las siguientes diluciones en DMEM sin complementar a partir del cultivo de colección de poliovirus silvestre tipo I: 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶, 10⁻⁷, 10⁻⁸, 10⁻⁹, 10⁻¹⁰, 10⁻¹¹, 10⁻¹², 10⁻¹³ y 10⁻¹⁴. Las monocapas celulares fueron inoculadas con 250 µl de las soluciones, respectivamente, e incubadas durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente, las monocapas infectadas fueron cubiertas con una capa de 1% agar (w/v), 5% NaHCO₃ (w/v), 45% DMEM 2x (v/v) (Gibco) en agua a 56°C.

Las monocapas infectadas se incubaron a 37°C durante 48 horas. Después, las capas de agar fueron removidas y los pozos de las cajas fueron teñidos con solución de cristal violeta (0.1% cristal violeta, 20% etanol) para revelar las placas virales. El título de poliovirus silvestre tipo I fue calculado a partir del número de placas observadas con la siguiente fórmula: número de placas x volumen del inóculo en ml x recíproco de la dilución. En este caso, se contaron 25 placas en la dilución 10⁻⁸. Por lo tanto, el título en unidades formadoras de placa por mililitro (pfu/ml) fue:

$$25 \text{ placas} \times 0.25 \text{ ml} \times 10^8 = 6.25 \times 10^8 \text{ pfu/ml}$$

Infección.

Monocapas celulares al 80% de confluencia fueron lavadas una vez con PBS. Posteriormente, se agregó el volumen de poliovirus correspondiente a la multiplicidad de infección (moi) deseada en medio DMEM no complementado. Las monocapas celulares fueron incubadas a temperatura ambiente durante 30 minutos para permitir la adsorción del virus. El medio fue retirado y se agregó DMEM complementado con 10% de SFB. Las células infectadas se mantuvieron como se describió anteriormente hasta que el efecto citopático fue visible por microscopía.

Transfección.

Monocapas de 1×10^6 células al 80% de confluencia fueron transfectadas transitoriamente con distintos plásmidos. La transfección se realizó utilizando el agente de transfección lipídico lipofectamina™ 2000 (Invitrogen Life Technologies), como se describe a continuación. 1×10^6 células fueron sembradas 24 horas antes de la transfección en DMEM sin antibióticos. 10 μ l de lipofectamina fueron diluidos en 250 μ l de DMEM sin complementar. Después de cinco minutos de incubación a temperatura ambiente, 4 μ g de ADN plasmídico diluidos en 250 μ l de DMEM sin complementar, fueron añadidos. La reacción fue incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, el volumen total de la reacción fue añadida a las células. Éstas fueron crecidas como se describió anteriormente.

Inmunoquímicas de células transfectadas.

Todos los reactivos utilizados en las inmunoquímicas, excepto los anticuerpos, se obtuvieron del kit Histostain®-DS (Zymed). Brevemente, monocapas de células no infectadas, infectadas con poliovirus atenuados a una moi de 10 y transfectadas con los plásmidos pVax 1, pVP4-1, pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4 respectivamente, fueron crecidas en cubreobjetos. Las monocapas fueron lavadas tres veces con PBS y fueron fijadas con formaldehído al 4% durante 15 minutos. Posteriormente, las monocapas fueron incubadas con H₂O₂ al 30% mezclado con metanol absoluto en proporción 9 a 1, respectivamente, durante 10 minutos. Las monocapas fueron lavadas tres veces con PBS y fueron incubadas con 100 μ l de solución bloqueadora [1% BSA, 0.05% T-PBS (0.1% Tween-20 en PBS)] durante 10 minutos.

Luego, se añadió el anticuerpo primario (diluido 1 en 50 en solución bloqueadora) que consistió en el suero humano. Al final de una hora de incubación, las monocapas fueron lavadas tres veces con 0.05% T-PBS. Se agregó el anticuerpo secundario (diluido 1 en 1000 en solución bloqueadora) que consistió en anti-IgM, IgG e IgA humanas conjugado a peroxidasa. Después de 30 minutos de incubación, las monocapas fueron lavadas tres veces con T-PBS y se añadieron 100 μ l de estreptavidina-peroxidasa. Las monocapas fueron incubadas durante 10 minutos y fueron lavadas tres veces con T-PBS.

Para revelar el anticuerpo secundario, se agregaron 100 μ l de mezcla sustrato-cromógeno preparado de la siguiente manera: 50 μ l del sustrato para peroxidasa aminoetil carbazol al 20x, 50 μ l de sustrato para peroxidasa al 20X en un ml de agua destilada. Se mezcló en el vórtex, se

añadieron 50 μl H_2O_2 al 0.6% y se mezcló nuevamente en el vórtex. Las monocapas fueron incubadas 10 minutos y fueron lavadas tres veces con 0.05% Tween-20 en agua destilada. Finalmente, las monocapas celulares fueron contrateñidas con solución de azul de metileno (50 μl de azul de metileno en tres ml de agua destilada) durante tres minutos, para contrastar la coloración rojiza de la peroxidasa y fueron observadas al microscopio. Todas las incubaciones fueron realizadas a temperatura ambiente.

Extracción de proteínas totales.

Monocapas de 1×10^6 células cultivadas en distintas condiciones fueron lavadas una vez con PBS. Posteriormente, las monocapas fueron recolectadas en 500 μl de buffer de lisis [1% deoxicolato de sodio, 1% Tritón x-100, 0.1% SDS, 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.2)]. Los detritus celulares fueron removidos por centrifugación a 1000 x g durante cinco minutos a 4°C. Los sobrenadantes fueron recolectados y se les añadieron inhibidores de proteasas (extracto pancreático 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, papaína 1 mg/ml, quimotripsina 1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, termolisina 0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$, tripsina 0.002 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Roche Diagnostics GmbH). Las proteínas totales presentes en los lisados celulares fueron cuantificadas por el método de Bradford de acuerdo con las instrucciones del proveedor (Bio-Rad). Los extractos de proteínas totales fueron guardados a -20°C.

Western Blot.

Las proteínas totales de células no infectadas, infectadas a una moi de 10 y transfectadas con los plásmidos pVax 1, pVP4-1, pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4 fueron obtenidas. Los extractos de proteínas totales fueron obtenidos a cuatro horas en células infectadas y a 24 horas en células no infectadas y en células transfectadas. Posteriormente, 20 μg de proteínas totales fueron incubados con solución de carga Laemli (Bio-Rad), 5% β -mercaptoetanol durante 10 minutos a 100°C. Las muestras fueron separadas por corrimiento electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% a 95 V durante 45 minutos. Las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa a 120 V durante una hora a 4°C en una cámara Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) en buffer de corrida 10x [3% (w/v) Tris-base, 14% (w/v) glicina, 5% SDS al 20%] diluido 1 en 10. Luego, las membranas fueron incubadas con solución bloqueadora [5% leche descremada, 0.1% Tween-20 en PBS] durante toda la noche a 4°C.

Las membranas fueron incubadas con el suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1 (diluido 1 en 100 en solución bloqueadora). Después de dos horas de incubación a temperatura ambiente, las membranas fueron lavadas tres veces durante cinco minutos con T-PBS. Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo secundario en contra de conejo conjugado a peroxidasa (diluido 1 en 2000 en solución bloqueadora). Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, las membranas fueron lavadas tres veces durante cinco minutos con 0.1% Tween-20 en PBS. Finalmente, las membranas fueron expuestas al agente quemiluminiscente luminol (ECL Amersham Biosciences) durante cinco minutos y fueron reveladas.

Marcaje metabólico radiactivo.

Las proteínas celulares de monocapas de células no infectadas, infectadas a una *moi* de 10 y transfectadas con pVax 1, pVP4-1, pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4, respectivamente, fueron marcadas metabólicamente con [³⁵S] metionina. Las monocapas celulares fueron incubadas de cuatro a seis horas con DMEM libre de metionina, pero que contenía 50 μ Ci de [³⁵S] metionina. En el caso de las células infectadas, el marcaje se llevó a cabo a las dos horas post infección. Después de 24 horas, las células fueron lisadas y las proteínas totales fueron cuantificadas como se describió anteriormente.

Radioinmunoprecipitación (RIPA).

Los extractos de proteínas totales de células marcadas metabólicamente con [³⁵S] metionina fueron incubados con suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1 durante toda la noche a 4°C para inmunoprecipitar las proteínas virales marcadas. Posteriormente, se añadieron 50 μ l de proteína A sefarosa al 30% y las muestras se incubaron durante seis horas a 4°C con agitación constante. Las muestras fueron lavadas dos veces con buffer de lisis y fueron incubadas con solución de Laemli y β -mercaptoetanol al 5%, durante 10 minutos a 100°C. Finalmente, las proteínas inmunoprecipitadas marcadas radiactivamente fueron separadas por SDS-PAGE y reveladas por autorradiografía.

Fusiones con GFP.

Los plásmidos pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4 fueron cortados con las endonucleasas de restricción *Xho*I y *Xba*I. El gen que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) fue fusionado río

abajo del promotor de CMV en pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4, como se describió anteriormente. Los siguientes plásmidos fueron obtenidos: pVP1-GFP, pVP2-GFP, pVP3-GFP y pVP4-GFP.

Los plásmidos obtenidos fueron propagados en la cepa DH5 α de *E. coli* como se describió anteriormente. La presencia del gen que codifica la proteína verde fluorescente en cada uno de los plásmidos construidos, fue detectada por PCR y por cortes con las enzimas de restricción *EcoRI* y *XbaI*. Una vez que la presencia de los genes que codifican la proteína verde fluorescente fue comprobada en los plásmidos respectivos, se realizaron cultivos de colección en glicerol.

Detección de fluorescencia.

Monocapas de 1×10^6 células fueron transfectadas con los plásmidos pVax 1, pGFP-C1, pVP1-GFP, pVP2-GFP, pVP3-GFP y pVP4-GFP. A las 24 horas post transfección, las células fueron lavadas tres veces con PBS y fijadas con formaldehído al 4% durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, las monocapas celulares fueron observadas al microscopio para la detección de fluorescencia.

Dosis letal 50 (LD₅₀).

La dosis letal 50 (LD₅₀) fue determinada mediante una serie de inoculaciones de distintas diluciones del poliovirus silvestre tipo 1 a los ratones de la cepa cPVR. Los ratones ($n = 8-10$) fueron inoculados por vía intramuscular en el músculo cuádriceps derecho con: 2×10^4 pfu, 2×10^5 pfu, 2×10^6 pfu y 2×10^7 pfu en 50 μ l, respectivamente. Los ratones fueron observados cada dos días durante una semana para la detección de síntomas característicos de poliomielitis parálitica: pelaje erizado, parálisis y/o muerte.

Vacunación.

Ratones de la cepa cPVR fueron inoculados con las vacunas de ADN previamente construidas: vADN1-PV y vADN2-PV. Los ratones ($n = 5$) recibieron tres dosis, por vía oral, de vADN1-PV o de vADN2-PV separadas por intervalos de tres semanas cada una. Cada dosis de vADN1-PV consistió en 100 μ g de pVP4-1 diluidos en 100 μ l de PBS y cada dosis de vADN2-PV consistió en 100 μ g de pVP1, 100 μ g de pVP2, 100 μ g de pVP3 y 100 μ g de pVP4 diluidos en 100 μ l de PBS. Los ratones del control negativo recibieron 100 μ l de PBS. Los ratones del control positivo fueron los ratones sobrevivientes del ensayo de determinación de la LD₅₀.

Obtención de suero.

Los ratones vacunados fueron sangrados cada tres semanas en la punta de la cola hasta obtener aproximadamente 200 µl de sangre de cada ratón. La coagulación sanguínea fue evitada utilizando 100 mM EDTA. Las muestras fueron incubadas durante 30 minutos a 4°C y fueron centrifugadas a 8500 x g durante cinco minutos a 4°C. El suero fue recolectado y fue guardado a -20°C.

Ensayos de neutralización.

Los sueros provenientes de ratones vacunados fueron diluidos 1 en 50, 1 en 150, 1 en 450, 1 en 1350, 1 en 4000, 1 en 12500, 1 en 37500 y 1 en 1×10^5 en PBS. 50 µl de suero fueron mezclados con 100 pfu y 500 pfu, respectivamente, de poliovirus silvestre tipo I contenidas en 50 µl. Las reacciones fueron incubadas durante una hora a temperatura ambiente. Posteriormente, 100 µl de cada reacción fueron adicionados a células contenidas en placas de 96 pozos (1×10^4 células/ pozo). Las células fueron incubadas durante 36 horas a 37°C. Finalmente, las células fueron lavadas tres veces con PBS y fueron teñidas con solución de cristal violeta. Se consideró que los sueros neutralizaron al poliovirus silvestre tipo I cuando más del 50% de las células sobrevivió. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

Reto viral.

Los ratones vacunados fueron retados con poliovirus silvestre tipo 1 cinco semanas después de la última dosis de vacuna. Los ratones fueron infectados por vía intramuscular con 5×10^7 pfu de poliovirus silvestre tipo 1. Los ratones fueron observados diariamente durante una semana para la detección de supervivencia o muerte.

RESULTADOS

Construcción de las vacunas de ADN.

Se construyeron dos vacunas de ADN que contenían los genes que codifican las proteínas de la cápside de poliovirus silvestre tipo I: vADN1-PV y vADN2-PV. Brevemente, los genes que codifican las proteínas de la cápside de poliovirus, previamente amplificados por PCR, fueron clonados en conjunto e individualmente en el plásmido pVax 1. La primera vacuna, denominada vADN1-PV, consistió en un plásmido con los cuatro genes que codifican las proteínas de la cápside de poliovirus silvestre tipo I: pVP4-1. La segunda vacuna, denominada vADN2-PV, consistió en un conjunto de cuatro plásmidos, donde cada plásmido contenía uno de los genes que codifican una de las cuatro proteínas de la cápside de poliovirus silvestre tipo I: pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4 (Figura 5).

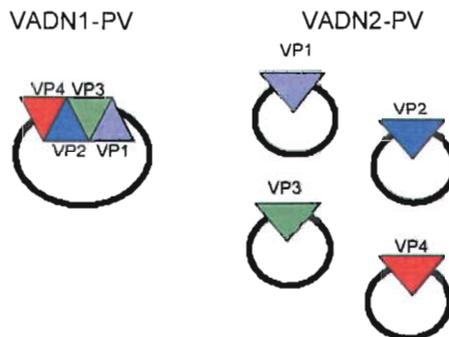


Figura 5. Vacunas de ADN contra la polio. La primera vacuna, denominada vADN1-PV, consistió en un plásmido que tenía clonados los cuatro genes que codifican las proteínas de la cápside de poliovirus silvestre tipo I: pVP4-1 (100 µg). La segunda vacuna, denominada vADN2-PV, consistió en un cocktail de cuatro plásmidos en donde cada uno de los cuatro genes que codifican las proteínas de la cápside de poliovirus silvestre tipo I, fue clonado individualmente en el plásmido pVax 1: pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4 (100 µg de cada plásmido).

La presencia de los genes que codifican las proteínas de la cápside de poliovirus silvestre tipo I en los plásmidos pVP4-1, pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4 fue comprobada por PCR (Figuras 6 y 7) y por secuenciación.



Figura 6. Plásmido que constituye la vacuna vADN1-PV. El control positivo consistió en una reacción de PCR en la que se utilizó el plásmido pXpA como molde, el cual consiste en el ADNc de poliovirus silvestre tipo 1. El control negativo consistió en reacciones de PCR en las que no se utilizó el plásmido pXpA como molde. (1) PCR control negativo de VP4-1 (2) PCR control positivo de VP4-1, ~4 µg (3) PCR de VP4-1 a partir de pVP4-1, ~2 µg.

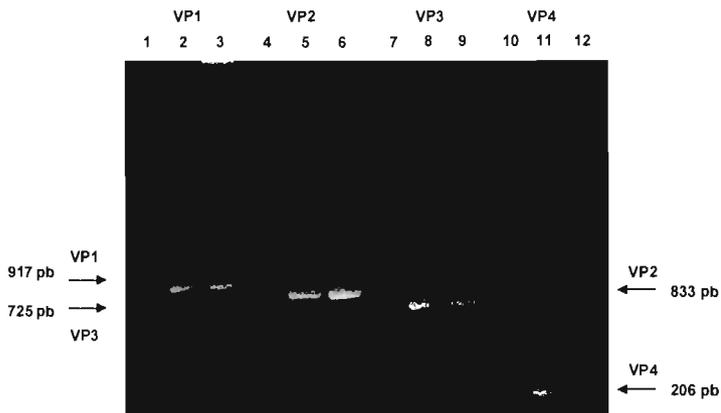


Figura 7. Plásmidos que constituyen la vacuna vADN2-PV. Los controles positivos consistieron en reacciones de PCR en las que se utilizó el plásmido pXpA como molde, el cual consiste en el ADNc de poliovirus silvestre tipo 1. Los controles negativos consistieron en reacciones de PCR en las que no se utilizó el plásmido pXpA como molde. (1) PCR control negativo de VP1 (2) PCR control positivo de VP1 (3) PCR de VP1 a partir de pVP1 (4) PCR control negativo de VP2 (5) PCR control positivo de VP2 (6) PCR de VP2 a partir de pVP2 (7) PCR control negativo de VP3 (8) PCR control positivo de VP3 (9) PCR de VP3 a partir de pVP3 (10) PCR control negativo de VP4 (11) PCR control positivo de VP4 (12) PCR de VP4 a partir de pVP4. Se analizaron ~2 µg de cada plásmido.

Expresión de las proteínas de la cápside de poliovirus silvestre tipo I.

Una vez que se verificó que las vacunas fueron construidas adecuadamente, se analizó la expresión de las proteínas codificadas por los genes que contenían. La expresión de las proteínas de la cápside del poliovirus silvestre tipo I fue analizada mediante inmunocitoquímica, Western blot, radioinmunoprecipitación y fusiones con el gen de la proteína verde fluorescente.

Primero, se analizó la expresión de las proteínas de la cápside mediante inmunocitoquímicas. Éstas fueron realizadas en monocapas celulares transfectadas transitoriamente con los plásmidos pVP4-1, pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4, respectivamente. Si los anticuerpos primarios se unen a las proteínas virales, éstos son reconocidos por los anticuerpos secundarios conjugados a peroxidasa. Ésta reacciona cuando se le provee el sustrato adecuado y da una coloración roja. Adicionalmente, las células fueron contrateñidas con azul de metileno. Éste tiñe el núcleo y el citoplasma de las células de color azul claro. También, el azul de metileno permite contrastar la coloración roja generada por la reacción de la peroxidasa. Así, las células positivas para la expresión de proteínas virales adquieren una coloración roja y azul, mientras que las células negativas para la expresión de proteínas virales sólo adquieren una coloración azul.

Cuando las muestras fueron observadas al microscopio, las células transfectadas con los distintos plásmidos presentaron una coloración azul. Algunas células infectadas presentaron áreas teñidas de rojo. Todas las células no infectadas presentaron una coloración azul (Figura 8).

Lo anterior indicó que no se detectó la expresión de las proteínas de cápside del poliovirus silvestre tipo I en ninguna de las muestras. Se observó que el suero de humano anti-poliovirus si fue capaz de detectar la expresión de proteínas virales en células infectadas con poliovirus atenuados. Sin embargo, el suero humano anti-poliovirus no detectó la expresión de proteínas en ninguna de las muestras de células transfectadas con los distintos plásmidos que codifican proteínas de cápside del poliovirus silvestre tipo I.

Se sugirieron distintas posibilidades para explicar la ausencia de detección de la expresión de las proteínas virales en las células transfectadas. Algunas posibilidades fueron: la ausencia de expresión de las proteínas virales, la incapacidad de los anticuerpos utilizados para detectar las proteínas virales, la rápida degradación de las proteínas virales o el secuestro de las proteínas virales en gránulos densos.

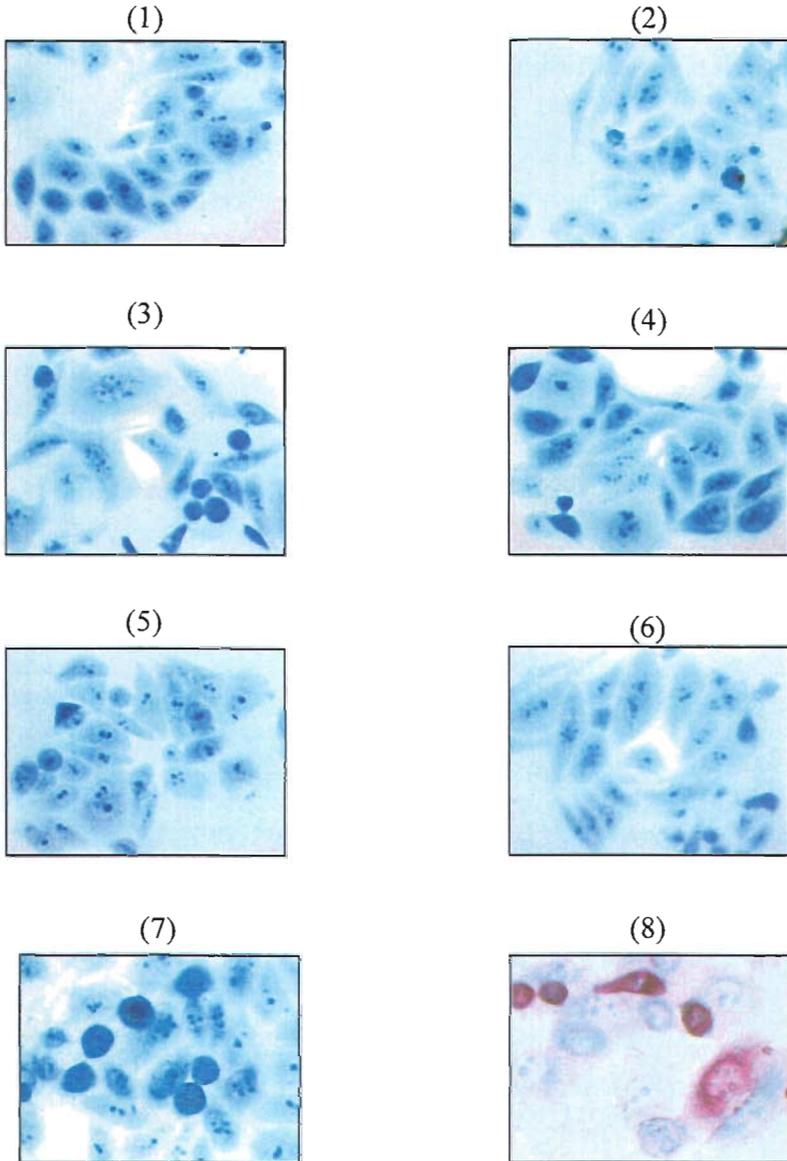


Figura 8. Inmunocitoquímicas de células transfectadas. (1) Células transfectadas con pVP4-1 (2) Células transfectadas con pVP1 (3) Células transfectadas con pVP2 (4) Células transfectadas con pVP3 (5) Células transfectadas con pVP4 (6) Células transfectadas con pVax 1 (7) Células sin infectar (8) Células infectadas con poliovirus atenuados (moi de 10).

Por lo tanto, se realizaron ensayos de Western blot con el fin de determinar si las proteínas de cápside eran expresadas en células transfectadas con los plásmidos que constituyen las vacunas de ADN. Los extractos de proteínas totales de las células transfectadas transitoriamente con los plásmidos pVP4-1, pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4 fueron obtenidos a las 24 horas post transfección. Los extractos fueron analizados por Western blot utilizando suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1.

Dos bandas proteínicas con pesos moleculares de 105 y 85 kDa, respectivamente, fueron observadas en los extractos de proteínas totales de células transfectadas con el plásmido pVP4-1. Las dos bandas también fueron observadas en el control positivo, que consistió en extractos de proteínas totales de células infectadas con poliovirus silvestre tipo I. Ninguna de las bandas fue observada en el control negativo que consistió en extractos de proteínas totales de células sin infectar. Sin embargo, también se observaron algunas bandas en el control negativo que seguramente corresponden al resultado de una reacción cruzada entre proteínas celulares y el suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1 (Figura 9).

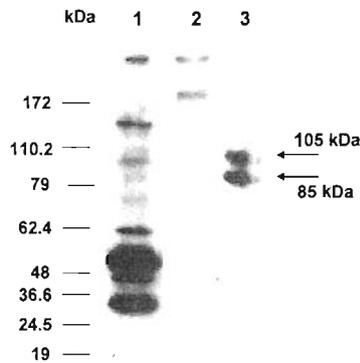


Figura 9. Western blot de extractos de proteínas totales de células HeLa transfectadas con el plásmido pVP4-1 y expuestos al suero de conejo antipoliovirus silvestre tipo I. (1) Control positivo, proteínas totales de células HeLa infectadas con poliovirus silvestre tipo I (moi de 10) (2) Control negativo, proteínas totales de células HeLa (3) Proteínas totales de células HeLa transfectadas con el plásmido pVP4-1.

Los pesos moleculares de las bandas proteínicas podrían sugerir que se trata de dos poliproteínas virales no procesadas. La banda de 105 kDa podría corresponder a una poliproteína (96 kDa) compuesta por las proteínas VP3 (26 kDa) y VP1 (33 kDa) no procesadas y por el polipéptido VP0 (37.4 kDa) no procesado. La banda de 85 kDa podría corresponder a una poliproteína (89 kDa) compuesta por las proteínas VP3 y VP1 no procesadas y por el polipéptido VP0 (37.4 kDa) procesado en las proteínas VP2 (30 kDa) y VP4 (7.4 kDa). Sin embargo, además del procesamiento viral, se deben considerar otras posibilidades como son: la degradación de las proteínas virales por proteasas celulares o la generación de productos incompletos o aberrantes de la traducción.

En el análisis por Western blot de los extractos de proteínas totales de células transfectadas a 24 horas con los plásmidos pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4 no se observaron bandas proteínicas del peso molecular correspondiente a las proteínas de cápside. Se observaron bandas en todas las muestras, que seguramente corresponden a una reacción cruzada entre proteínas celulares y el suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1. Se sabe que las proteínas de la cápside son inestables cuando se expresan individualmente. Por lo tanto, con base a los resultados anteriores, se exploró la posibilidad de que las proteínas de cápside se expresaran, pero que se degradaran antes de 24 horas. Sin embargo en el análisis por Western blot de extractos de proteínas totales de células transfectadas con los plásmidos pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4 no se observó ninguna banda proteínica (Figura 10).

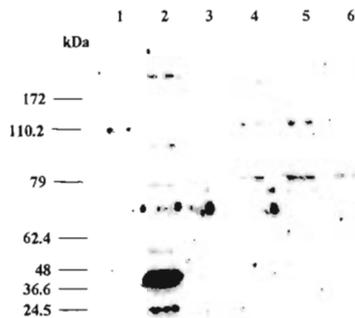


Figura 10. Western blot de extractos de proteínas totales de células HeLa transfectadas con los plásmidos pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4 a 24 horas. (1) Control negativo, proteínas totales de células HeLa (2) Control positivo, proteínas totales de células HeLa infectadas con poliovirus (moi de 10). (3) Proteínas totales de células HeLa transfectadas con el plásmido pVP1 (4) Proteínas totales de células HeLa transfectadas con el plásmido pVP2 (5) Proteínas totales de células HeLa transfectadas con el plásmido pVP3 (6) Proteínas totales de células HeLa transfectadas con el plásmido pVP4.

Los resultados anteriores sugirieron las siguientes posibilidades. La primera, que las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4 no se expresaron en las células transfectadas. La segunda, que las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4 se expresaron a las 24 horas, pero en una concentración tan baja que no fueron detectadas por el suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo I.

Con el fin de evaluar las posibilidades anteriores, se llevaron a cabo ensayos de radioinmunoprecipitación. Las proteínas totales marcadas con metionina radiactiva y obtenidas a partir de células transfectadas con los plásmidos pVP4-1, pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4, fueron inmunoprecipitadas con el suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1. Los complejos de proteínas virales y anticuerpos fueron revelados por autorradiografía.

No se observaron bandas proteínicas en ninguna de las muestras de proteínas totales inmunoprecipitadas a partir de células transfectadas con los plásmidos pVP4-1, pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4. En el control positivo que consistió en proteínas totales inmunoprecipitadas obtenidas a partir de células infectadas, se observaron varias bandas en el control positivo. Las bandas seguramente corresponden a proteínas virales inmunoprecipitadas, como la proteína 3C. Se observaron algunas bandas en el control negativo que consistió en proteínas totales inmunoprecipitadas obtenidas a partir de células sin infectar. Las bandas probablemente corresponden a una reacción cruzada entre proteínas celulares y el suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1 (Figura 11).

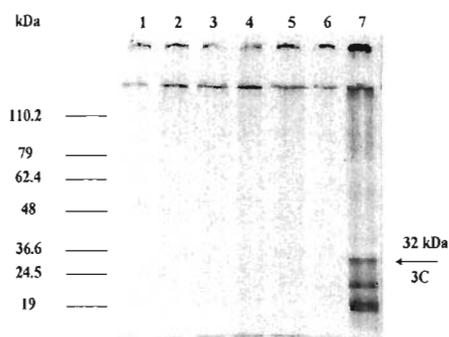


Figura 11. Radioinmunoprecipitación. Las proteínas celulares totales fueron marcadas metabólicamente con [³⁵S] metionina. Posteriormente, las proteínas virales marcadas fueron inmunoprecipitadas con suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1 y fueron reveladas por autorradiografía. (1) Proteínas totales de células transfectadas con el plásmido pVP4-1 (2) Proteínas totales de células transfectadas con el plásmido pVP1 (3) Proteínas totales de células transfectadas con el plásmido pVP2 (4) Proteínas totales de células transfectadas con el plásmido pVP3 (5) Proteínas totales de células transfectadas con el plásmido pVP4 (6) Control negativo, proteínas totales de células sin infectar (7) Control positivo, proteínas totales de células infectadas con poliovirus silvestre (moi de 10).

Los resultados de la radioinmunoprecipitación sugirieron lo siguiente. En el caso de las poliproteínas codificadas por el plásmido pVP4-1, se observó que éstas fueron expresadas por las células transfectadas, como se determinó por Western blot. Sin embargo, los resultados de la radioinmunoprecipitación indicaron que las poliproteínas anteriores no fueron detectadas. Consecuentemente, se sugirió que probablemente el suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1 no reconoció las poliproteínas de 105 y 85 kDa en la conformación en que son expresadas por las células transfectadas. En el caso de las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4, no se pudo determinar mediante radioinmunoprecipitación si éstas eran expresadas o no por las células transfectadas.

Como no se pudo determinar la expresión de las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4 ni por inmunocitoquímica, ni por Western blot, ni por radioinmunoprecipitación, aun no se podía descartar si la falta de detección se debía a que las proteínas no eran expresadas o a que no eran inmunoprecipitadas. Por lo tanto, se cambió de estrategia y se determinó indirectamente la expresión de las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4 utilizando el gen reportero que codifica la proteína verde fluorescente.

Las fusiones consistieron en la inserción del gen GFP en el extremo 3' de los genes que codifican las proteínas de la cápside contenidas en los plásmidos pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4, respectivamente. Las células transfectadas con los plásmidos pVP1-GFP, pVP2-GFP, pVP3-GFP y pVP4-GFP, respectivamente, fueron observadas al microscopio para la detección de fluorescencia. Ésta fue detectada en monocapas celulares transfectadas con los plásmidos pVP1-GFP, pVP2-GFP, pVP3-GFP y pVP4-GFP. También se detectó fluorescencia en el control positivo que consistió en células transfectadas con el plásmido pGFP-C1. No se detectó fluorescencia en el control negativo que consistió en células sin transfectar (Figura 12).

La detección de fluorescencia en las células transfectadas indicó la expresión de la proteína verde fluorescente. El gen que codifica la proteína verde fluorescente se localiza río abajo de las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4. De esta manera, para que la proteína verde fluorescente se exprese, las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4 deben expresarse primero. Así, lo anterior sugiere que probablemente las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4 se expresan en las células transfectadas.

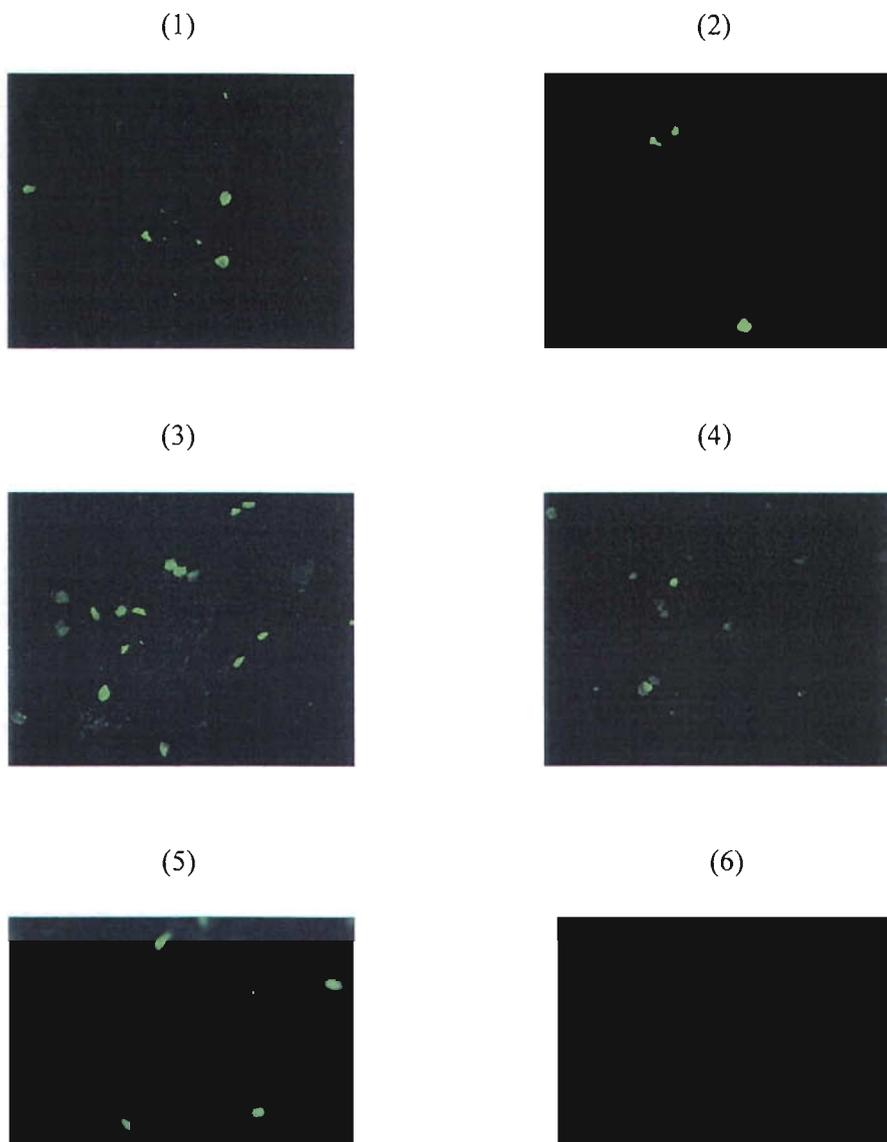


Figura 12. Expresión de la proteína verde fluorescente. Expresión de la proteína verde fluorescente en células transfectadas con los plásmidos: (1) pVP1-GFP (2) pVP2-GFP (3) pVP3-GFP y (4) pVP4-GFP (5) control positivo (6) control negativo.

Generación de anticuerpos neutralizantes contra el poliovirus silvestre tipo I.

Una vez que se observó directa o indirectamente la expresión de las proteínas virales codificadas por los plásmidos, se analizó si las vacunas de ADN construidas conferían protección en contra del poliovirus silvestre tipo I. Se utilizaron ratones de la cepa cPVR que son transgénicos para el receptor humano del poliovirus y que asimismo, son susceptibles a la infección por poliovirus.

Primero, se analizó la generación de anticuerpos neutralizantes en contra del poliovirus en los ratones vacunados. Los ratones recibieron tres dosis por vía oral de las vacunas vADN1-PV y vADN2-PV, respectivamente. Al cabo de tres semanas después de cada dosis de vacunación, se obtuvo el suero de los ratones (Figura 13).

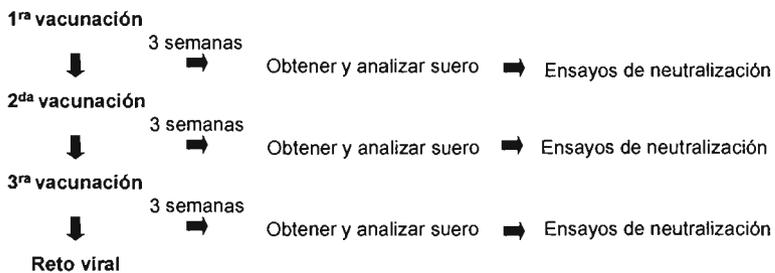


Figura 13. Esquema de vacunación para las vacunas de ADN. Los ratones ($n = 4$ o 5) recibieron tres dosis, por vía oral, de vADN1-PV o de vADN2-PV separadas por intervalos de tres semanas cada una. Cada dosis de vADN1-PV consistió en $100 \mu\text{g}$ de pVP4-1 diluidos en $100 \mu\text{l}$ de PBS y cada dosis de vADN2-PV consistió en $100 \mu\text{g}$ de pVP1, $100 \mu\text{g}$ de pVP2, $100 \mu\text{g}$ de pVP3 y $100 \mu\text{g}$ de pVP4 diluidos en $100 \mu\text{l}$ de PBS. Los ratones del control negativo recibieron $100 \mu\text{l}$ de PBS.

Se realizaron ensayos de neutralización para determinar si los sueros de los ratones vacunados tenían capacidad neutralizante contra el poliovirus silvestre tipo I. La capacidad de los anticuerpos se determinó con base a la supervivencia de monocapas celulares en presencia de poliovirus silvestre tipo I. Se consideró que el suero tenía capacidad neutralizante contra el poliovirus silvestre tipo I cuando $\geq 50\%$ de las células de cada pozo sobrevivió.

Ninguno de los sueros obtenidos después de la primera y la segunda dosis de vacunación fue capaz de neutralizar al poliovirus silvestre tipo I. Se observó que todos los sueros obtenidos después de la tercera dosis de la vADN2-PV fueron capaces de neutralizar al poliovirus a una

dilución máxima de 1 en 450. Solamente algunos de los sueros obtenidos después de la tercera dosis de la vADN1-PV fueron capaces de neutralizar al poliovirus. En cambio, todos los sueros del control positivo fueron capaces de neutralizar al poliovirus a una dilución máxima de 1 en 12500. Los sueros de los ratones vacunados con la vADN2-PV neutralizaron al poliovirus a una dilución tres veces mayor (1 en 450) que los sueros de los ratones vacunados con la vADN1-PV (1 en 150). Sin embargo, los sueros de los ratones del control positivo neutralizaron al poliovirus a una dilución hasta nueve veces mayor que la observada en los ratones vacunados (1 en 12500) (Figura 14).

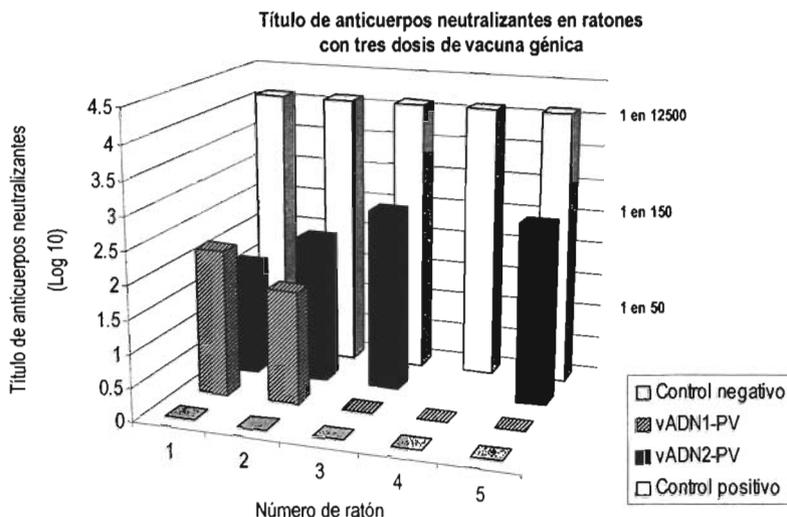


Figura 14. Título de anticuerpos neutralizantes en el suero de ratones vacunados con tres dosis de vacuna génica. El control positivo consistió en el suero de ratones sobrevivientes a la LD₅₀. El control negativo consistió en el suero de ratones que recibieron PBS. Todos los sueros obtenidos a partir de ratones vacunados con tres dosis de la vADN2-PV (n = 5) neutralizaron al poliovirus silvestre tipo I *in vitro*. Solamente dos de los sueros obtenidos a partir de ratones vacunados con tres dosis de la vADN1-PV (n = 4) neutralizaron al poliovirus silvestre tipo I *in vitro*. El título de anticuerpos neutralizantes corresponde a los datos obtenidos a partir de los ensayos de neutralización utilizando 100 pfu de poliovirus silvestre tipo I. Los ensayos fueron realizados por duplicado.

Los resultados anteriores indican que ambas vacunas de ADN fueron capaces de inducir la generación de anticuerpos que neutralizan *in vitro* al poliovirus silvestre tipo I. Además, el título de anticuerpos neutralizantes generados por la vADN2-PV (log 2.5) fue sutilmente mayor que el generado por la vADN1-PV (log 2).

Supervivencia de los ratones al reto viral.

Con el fin de determinar si la capacidad neutralizante *in vitro* de los anticuerpos correspondía a la capacidad neutralizante *in vivo*, los ratones vacunados fueron sometidos a un ensayo de protección. Éste consistió en retar a los ratones vacunados con una dosis letal de poliovirus silvestre. Con este propósito, se calculó la dosis letal mínima de poliovirus silvestre en los ratones cPVR. Primero, se determinó el título de poliovirus en el stock producido mediante ensayos de formación de placa, en donde cada placa representa una célula lisada por una partícula viral. El título del stock de poliovirus fue calculado a partir del número de placas observadas y fue de 6×10^8 unidades formadoras de placa por mililitro (pfu/ml).

Posteriormente, se determinó el número de unidades formadoras de placa por mililitro de poliovirus silvestre que correspondían a la LD₅₀. Ésta se define como la dilución viral que mata al 50% de los animales infectados. Los ratones fueron inoculados, por vía intra muscular, con distintas concentraciones de unidades formadoras de placa de poliovirus silvestre y fueron observados durante una semana para la detección de síntomas característicos de la polio. Cinco de los ratones inoculados con 2×10^4 pfu (n = 8), tres de los ratones inoculados con 2×10^5 pfu (n = 10) y un ratón de los inoculados con 2×10^6 pfu (n = 10) manifestaron pelaje erizado al sexto día post inoculación. Ninguno de los ratones inoculados con 2×10^4 pfu ó 2×10^5 pfu desarrolló parálisis. En cambio, dos de los ratones inoculados con 2×10^6 pfu y siete de los ratones inoculados con 2×10^7 desarrollaron parálisis a partir del tercer día post inoculación. La parálisis se presentó primero en la pata inoculada y posteriormente en ambas patas traseras. Todos los ratones que desarrollaron parálisis murieron por paro respiratorio al sexto día post inoculación (Tabla 6).

Tabla 6. Manifestación de síntomas característicos de la polio en ratones cPVR inoculados con poliovirus silvestre tipo 1.

| Concentración de poliovirus ¹ | Síntomas ² | | | Número de ratones muertos ³ |
|--|-----------------------|-----------|--------|--|
| | Pelaje erizado | Parálisis | Muerte | |
| 2×10^4 | 5 | 0 | 0 | 0/8 |
| 2×10^5 | 3 | 0 | 0 | 0/10 |
| 2×10^6 | 1 | 2 | 2 | 2/10 |
| 2×10^7 | 0 | 7 | 7 | 7/10 |

¹ Concentración de poliovirus en unidades formadoras de placa por 50 µl.

² Número de ratones que presentaron los síntomas descritos.

³ Número de ratones muertos por número total de ratones inoculados.

El número de unidades formadoras de placa por mililitro de poliovirus silvestre correspondiente a la LD₅₀ fue calculado mediante la interpolación de diluciones por el método de Reed y Muench. La LD₅₀ del poliovirus silvestre tipo 1 en los ratones cPVR fue de 6×10^6 pfu/ ml.

Finalmente, con el fin de evaluar si las vacunas de ADN construidas conferían protección en contra de una infección letal de poliovirus silvestre, los ratones vacunados fueron retados con poliovirus silvestre tipo 1. El grupo vacunado con la vADN1-PV consistió en cuatro ratones y el grupo vacunado con la vADN2-PV consistió en cinco ratones. Los ratones fueron inoculados con 5×10^7 pfu de poliovirus silvestre que representan ocho veces la LD₅₀ (Figura 13).

La supervivencia de los ratones fue evaluada cada dos días durante una semana para la detección de síntomas característicos de poliomielitis. Sin embargo, los ratones no manifestaron ningún síntoma, sólo sucumbieron ante la infección por poliovirus silvestre. Los ratones vacunados con la vADN1-PV murieron a los 3.3 ± 1 días después del reto viral. También, los ratones vacunados con la vADN2-PV murieron, pero a los 2.8 ± 0.8 días después del reto viral. El 100% de los ratones del control negativo, que consistió en ratones inoculados con PBS, murió a los 2.2 ± 0.8 días después del reto viral. En cambio, el 100% de los ratones del control positivo, que consistió en los ratones sobrevivientes de los experimentos de determinación de la LD₅₀, sobrevivió al reto viral (Figura 15).

Supervivencia de ratones vacunados retados con poliovirus silvestre

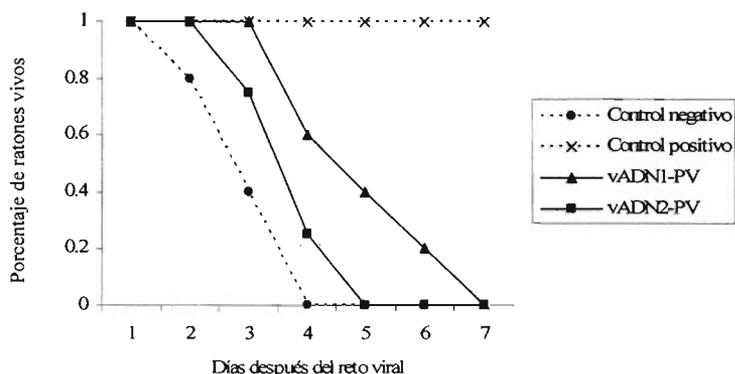
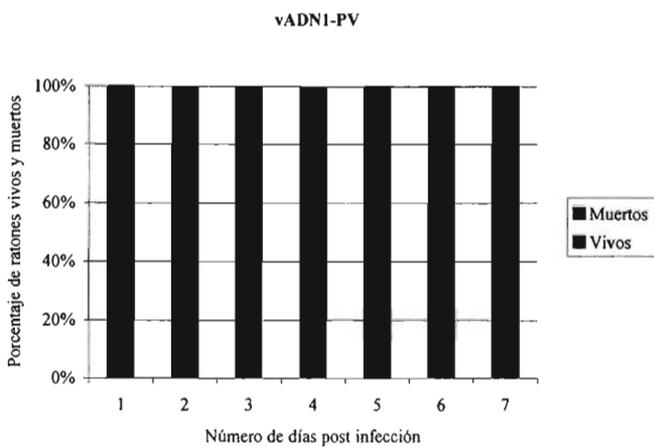


Figura 15. Supervivencia de los ratones vacunados retados con poliovirus silvestre tipo 1. Los ratones fueron vacunados tres veces (días 0, 21 y 42) con vADN1-PV (100 µg de pVP4-1 diluidos en 100 µl de PBS) o con vADN2-PV (100 µg de pVP1, 100 µg de pVP2, 100 µg de pVP3 y 100 µg de pVP4 en 100 µl de PBS). Los ratones del control negativo recibieron 100 µl de PBS y los ratones del control positivo consistieron en ratones que sobrevivieron la infección de 2×10^4 pfu de poliovirus silvestre en el ensayo de determinación de la LD₅₀. Los ratones fueron retados con 5×10^7 pfu de poliovirus silvestre tipo 1 tres semanas después de la última vacunación. Los resultados se muestran como el porcentaje de supervivencia de cada grupo vacunado (n = 4 o 5 en cada grupo).

De manera interesante, se observó que el 50% de los ratones vacunados con la vADN1-PV sobrevivió hasta 4.5 días post infección. En cambio, el 50% de los ratones vacunados con la vADN2-PV sobrevivió sólo 3.5 días post infección. Además, los ratones vacunados con la vADN2-PV empezaron a morir antes que los ratones vacunados con la vADN1-PV, a los dos y a los tres días, respectivamente. Así mismo, el 100% de los ratones vacunados con la vADN2-PV murió a los cinco días post infección mientras que el 100% de los ratones vacunados con la vADN1-PV murió hasta los siete días post infección (Figura 16).

Supervivencia y mortalidad de los ratones vacunados con las vacunas génicas

a)



b)

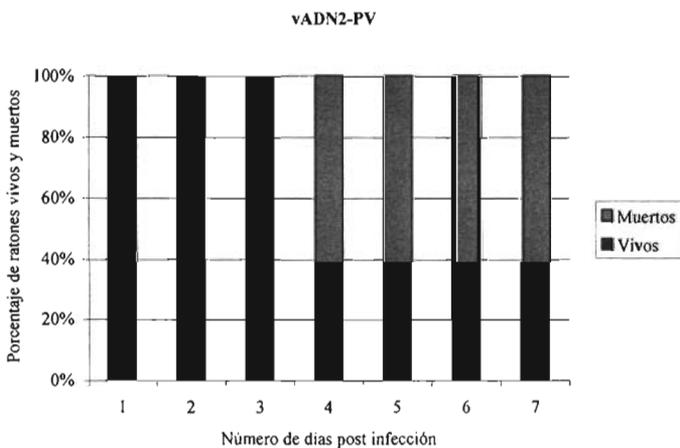


Figura 16. Supervivencia y mortalidad de los ratones vacunados con las vacunas génicas. (a) Los ratones que fueron vacunados con la vADN1-PV y retados con poliovirus silvestre tipo 1, sobrevivieron hasta los seis días post infección y comenzaron a morir a los cuatro días post infección. (b) Los ratones que fueron vacunados con la vADN2-PV y retados con poliovirus silvestre tipo 1, sobrevivieron hasta los cuatro días post infección y comenzaron a morir a los tres días post infección.

DISCUSIÓN

Las principales ventajas de las vacunas de ADN sobre los demás tipos de vacunas existentes son su estabilidad y la fácil manipulación de los genes contenidos que codifican los antígenos de interés. La primera generación de vacunas de ADN ha demostrado que éstas son efectivas en la inducción de una respuesta inmune protectora y que los riesgos de uso son mínimos (Liu 2003).

En este estudio, se construyeron dos vacunas de ADN en contra de la poliomieltis utilizando el vector pVax 1 (FDA, 1996). La primera vacuna, denominada vADN1-PV, consistió en un plásmido, pVP4-1, que contiene los cuatro genes que codifican las proteínas de la cápside de poliovirus. La segunda vacuna, denominada vADN2-PV, consistió en un cocktail de cuatro plásmidos, pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4, donde cada plásmido contiene uno de los genes que codifican una de las cuatro proteínas de la cápside de poliovirus.

Se realizaron inmunocitoquímicas con el fin de determinar la expresión directa de las proteínas de la cápside codificadas por cada uno de los plásmidos. Sin embargo, ninguna proteína fue detectada en células transfectadas con los plásmidos pVP4-1, pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4, respectivamente. La incapacidad de detectar la expresión de las proteínas se podría deber a las siguientes posibilidades: a la ausencia de expresión de las proteínas virales, a la incapacidad de los anticuerpos utilizados para detectar las proteínas virales, a la rápida degradación de las proteínas virales o al secuestro de las proteínas virales en gránulos densos.

La ausencia de expresión de las proteínas virales es poco probable ya que la construcción adecuada de los plásmidos que constituyen ambas vacunas fue corroborada por análisis de PCR y por secuenciación. La incapacidad de los anticuerpos utilizados para detectar las proteínas virales también es poco probable. Se esperaría que el suero humano utilizado tuviera anticuerpos policlonales que reconocieran epítopes conformacionales y secuenciales del poliovirus. Cabe mencionar que el suero humano anti-poliovirus no es hiperinmune, por lo que el título de anticuerpos policlonales en contra del poliovirus seguramente es bajo. Lo anterior podría favorecer la no detección de las proteínas virales, aún cuando éstas se expresaran en las células transfectadas. La rápida degradación de las proteínas virales es probable ya que las proteínas de la cápside viral son sumamente inestables cuando no se autoensamblan espontáneamente entre sí para formar cápsides. La degradación rápida de las proteínas no permitiría que se ensamblaran y que generaran epítopes conformacionales que fueran reconocidos por el suero de conejo anti-

poliovirus silvestre tipo 1. Finalmente, existe la posibilidad de que las proteínas sean expresadas, pero que se doblen de manera inadecuada y sean secuestradas en gránulos densos para su posterior degradación. Lo anterior es un evento probable ya que las proteínas de la cápside también son inestables debido a la falta de modificaciones posttraduccionales (Howley et al., 2001).

Posteriormente, se realizaron ensayos de Western blot, también con el fin de analizar la expresión directa de las proteínas de la cápside codificadas por cada uno de los plásmidos. En el Western blot realizado a partir de células transfectadas con el plásmido pVP4-1 se observaron dos bandas de 105 y 85 kDa. Éstas probablemente corresponden a proteínas virales no procesadas codificadas por el plásmido pVP4-1. Como se mencionó anteriormente, el peso molecular de las proteínas virales observado en geles de SDS-PAGE varía ligeramente con respecto a los pesos moleculares exactos (Ansardi et al., 1991 y 1995). Con base a lo anterior, la banda de 105 kDa podría consistir en una poliproteína (96 kDa) compuesta por las proteínas VP3 (26 kDa) y VP1 (33 kDa) no procesadas y por el polipéptido VP0 (37.4 kDa) no procesado. Consiguientemente, la banda de 85 kDa podría consistir en una poliproteína (89 kDa) compuesta por las proteínas VP3 y VP1 no procesadas y por el polipéptido VP0 (37.4 kDa) procesado en las proteínas VP2 (30 kDa) y VP4 (7.4 kDa).

En una infección por poliovirus, el genoma viral codifica una poliproteína que es procesada cotraduccionalmente por proteasas virales en las regiones P1, P2 y P3. Posteriormente, la región P1 es procesada por la proteasa 3CD^{pro} en las proteínas VP3 (26 kDa) y VP1 (33 kDa) y en el polipéptido VP0 (37.4 kDa), compuesto por las proteínas VP4 (7.4 kDa) y VP2 (30 kDa) no procesadas. Finalmente, el polipéptido VP0 es procesado en las proteínas VP2 y VP4. Se han propuesto dos posibilidades para el procesamiento del polipéptido VP0. La primera, es que éste es procesado por una proteasa viral, que todavía no ha sido identificada (Howley et al., 2001). La segunda y la más aceptada, es que el polipéptido VP0 es procesado mediante un mecanismo autocatalítico en el que participan la proteína VP2 y el ARN viral (Harber et al., 1991, Hindiyeh et al., 1999).

El plásmido pVP4-1 contiene los genes que codifican las cuatro proteínas de la cápside, pero no contiene el gen que codifica la proteasa 3CD^{pro}. Por lo tanto, aunque la región P1 se exprese, no puede ser procesada ya que necesita la proteasa 3CD^{pro} que no está presente. Así, la presencia de la proteína de 85 kDa podría explicarse mediante el mecanismo autocatalítico

mediante el cual VP4 (7.4 kDa) sería liberada del polipéptido VP0 (37.4 kDa) mientras que VP2 (30 kDa) continuaría unida a las proteínas VP3 (26 kDa) y VP1 (33 kDa) no procesadas. No obstante, es necesario realizar más experimentos para corroborar lo anterior.

Existen otras posibilidades que podrían explicar la presencia de las dos especies distintas de poliproteínas observadas. La primera, es la degradación de las proteínas virales por proteasas celulares y la segunda es la generación de productos incompletos o aberrantes de la traducción. Es posible que las proteínas virales expresadas sean degradadas rápidamente ya que no pueden ser procesadas y así estabilizarse mediante autoensamblaje en cápsides (Brautigam et al., 1993). En este caso, la poliproteína de menor peso molecular, 85 kDa, correspondería al producto viral parcialmente degradado, ya sea en el extremo amino o carboxilo terminal. Sin embargo, para determinar si las proteínas virales expresadas se están degradando, es necesario determinar su vida media. También, se ha reportado que la traducción ineficiente de moléculas de ARN mensajero de algunos Picornavirus genera productos de traducción incompletos o aberrantes debido a pausas que ocurren durante la traducción. Es poco probable que lo anterior suceda en este estudio, ya que el fenómeno anterior ocurre principalmente cuando los virus crecen a temperaturas menores a 37 °C (Brautigam et al., 1993). Además, se ha reportado que la línea celular HeLa, utilizada en este estudio, favorece la traducción de alta fidelidad de las moléculas de ARN mensajero viral (Molla et al., 1991).

En el Western blot realizado a partir de células transfectadas con los plásmidos pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4, respectivamente, no se observaron bandas que correspondieran al peso molecular esperado. Una posible explicación es que la eficiencia de transfección haya sido baja. De esta manera, la no detección de las proteínas virales probablemente se debería a que sólo un número limitado de células contiene el plásmido y expresa las proteínas virales. Consiguientemente, las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4 se expresarían en cantidades insuficientes para ser reconocidas por el suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1.

Otra posible explicación, es la rápida degradación de las proteínas virales ya que son inestables cuando no se ensamblan entre sí. Como se mencionó anteriormente, la región P1 es procesada por la proteasa 3CD^{pro} en las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4 durante distintas etapas de la morfogénesis de las partículas virales. Los extremos amino terminales de las proteínas VP1, VP2 y VP3 procesadas interactúan entre sí para estabilizarse y formar protómeros. La proteína VP4 procesada funciona como una extensión del extremo amino terminal de VP2 que interactúa

con VP1 y VP3 (Howley et al., 2001). Como las transfecciones fueron realizadas por separado con cada uno de los plásmidos, es probable que aunque las proteínas se hayan expresado, éstas no se hayan estabilizado entre sí ya que las demás proteínas de la cápside no estaban presentes. Al no poder interactuar entre sí y estabilizarse, como sucede normalmente durante la morfogénesis viral, las proteínas de la cápside podrían haber sido degradadas rápidamente.

En los ensayos de radioinmunoprecipitación realizados a partir de células transfectadas con los plásmidos pVP4-1, pVP1, pVP2, pVP3 o pVP4, respectivamente, no se observaron bandas que correspondieran al peso molecular esperado. Lo anterior sugiere que el suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1 no reconoce, no une y no inmunoprecipita las proteínas virales codificadas por los plásmidos pVP4-1, pVP1, pVP2, pVP3 y pVP4.

Los resultados del ensayo de Western blot a partir de células transfectadas con el plásmido pVP4-1 indican que hay poliproteínas virales que se expresan y que son reconocidas por el suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1. No obstante, en el caso de la radioinmunoprecipitación las poliproteínas virales expresadas no son reconocidas por el mismo suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1. Es necesario mencionar que en el Western blot las proteínas totales de las muestras fueron desnaturalizadas para poder separarlas por SDS-PAGE. Consecuentemente, es posible que la estructura de las poliproteínas expresadas por las células transfectadas haya sido modificada de tal manera que hayan expuesto epítopes secuenciales. De esta manera, el suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1 utilizado reconocería epítopes secuenciales localizados en las proteínas de la cápside contenidas en las poliproteínas expresadas por las células transfectadas.

En la radioinmunoprecipitación, el suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1 estuvo en contacto con las proteínas antes de que fueran desnaturalizadas para su separación por SDS-PAGE. Por lo tanto, es probable que la estructura de las poliproteínas expresadas por las células transfectadas no haya sido modificada en el ensayo de radioinmunoprecipitación. De esta manera, el suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo 1 utilizado uniría tanto epítopes secuenciales como conformacionales presentes en las proteínas expresadas por las células transfectadas. Se sabe que la presencia de epítopes conformacionales depende de la estructura terciaria o cuaternaria que adoptan las proteínas al doblarse después de ser expresadas (Howley et al., 2001). Es posible que algunos epítopes secuenciales no estén expuestos en las proteínas cuando éstas se encuentran en la conformación adquirida durante su expresión en células transfectadas. Así, se

podría explicar la incapacidad del suero de conejo anti-poliovirus silvestre tipo I para detectar las poliproteínas virales expresadas por las células transfectadas con el plásmido pvP4-1.

Puesto que la expresión de las proteínas virales VP1, VP2, VP3 y VP4 no fue detectada ni por inmunocitoquímica, ni por Western blot, ni por radioinmunoprecipitación, se decidió determinar su expresión de manera indirecta mediante fusiones con la proteína verde fluorescente. En este ensayo se observó la expresión de la proteína verde fluorescente, pero no la expresión directa de cada una de las proteínas virales. Sin embargo, el gen que codifica la proteína verde fluorescente se localiza río abajo de las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4 y todas están bajo el control del promotor de CMV. De esta manera, para que la proteína verde fluorescente se exprese, las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4 deben expresarse primero. Así, la fluorescencia observada en células transfectadas con los plásmidos pVP1-GFP, pVP2-GFP, pVP3-GFP y pVP4-GFP, respectivamente, sugiere fuertemente la posible expresión de cada una de las proteínas de la cápside en las células transfectadas.

Durante una infección por poliovirus en humano se genera una respuesta inmune específica en contra del virus que se caracteriza por una respuesta humoral y una respuesta celular (Leclerc et al., 1991). Sin embargo, solamente la respuesta inmune humoral se ha asociado a la protección en contra del poliovirus (WHO 1993). La respuesta inmune humoral se induce mediante la replicación del poliovirus en la faringe y en el intestino. La respuesta inmune humoral se divide en sistémica y local. La primera, consiste en la producción de anticuerpos séricos de tipo IgM e IgG serotipo específicos que bloquean la entrada del poliovirus al SNC (WHO 1993). La segunda, consiste en la producción de anticuerpos secretores de tipo IgA serotipo específicos que reducen la excreción del poliovirus presente en el tracto gastrointestinal. Los anticuerpos IgA son secretados por las células plasmáticas del intestino a las mucosas gastrointestinales (Ouzilou et al., 2002).

Una respuesta inmune protectora en contra del poliovirus consiste, principalmente, en la generación de anticuerpos neutralizantes serotipo específicos en contra del poliovirus. El proceso anterior recibe el nombre de seroconversión (WHO 1993). Asimismo, se considera que la manera más adecuada de analizar la respuesta inmune humoral protectora en contra del poliovirus es mediante la generación de anticuerpos neutralizantes. La capacidad neutralizante de los anticuerpos involucra el reconocimiento de sitios antigénicos del virus. Los anticuerpos en contra de poliovirus se unen a los sitios antigénicos y neutralizan al poliovirus, alterando su capacidad de

infección (Vrijzen et al., 1993). Como se mencionó anteriormente, los sitios antigénicos son epítopes que constituyen el blanco de los anticuerpos neutralizantes y están formados por secuencias independientes o combinadas de las proteínas VP1, VP2 y/o VP3 (Herremans et al., 2000).

En este estudio se utilizó la cepa murina cPVR como modelo para determinar si las vacunas de ADN construidas inducían una respuesta inmune protectora en contra del poliovirus. La cepa cPVR consiste en ratones transgénicos donde el receptor humano de poliovirus se encuentra bajo el control del promotor de β -actina (Crotty et al., 2002). La cepa anterior permite evaluar la capacidad protectora conferida por las vacunas de ADN con base a la ausencia o presencia de síntomas característicos de la polio en ratones infectados con poliovirus. Además, los ratones de la cepa cPVR pueden generar una respuesta inmune protectora en contra del poliovirus (Cortty et al., 2002).

Se ha demostrado que la respuesta inmune generada por los ratones de la cepa cPVR en contra del poliovirus, depende de la cepa de poliovirus inoculada, del sitio de replicación del poliovirus y de la vía de inoculación utilizada. Los ratones de la cepa cPVR expresan el receptor humano de poliovirus en cerebro, hígado, intestino delgado, médula espinal y músculo. La replicación del poliovirus se lleva a cabo en los mismos órganos. Los ratones de la cepa cPVR son susceptibles a la infección por poliovirus por vía intracerebral, intramuscular, intranasal, intraperitoneal e intravenosa (Crotty et al., 2002).

En este estudio, los ratones fueron vacunados por vía oral con tres dosis de la vADN1-PV o la vADN2-PV, separadas por un intervalo de tres semanas cada una y luego fueron retados con poliovirus silvestre tipo I. El esquema de vacunación se diseñó con el fin de mantener las condiciones de vacunación establecidas para la VOP. Se dieron tres dosis de inmunización antes del reto viral ya que se ha reportado que los anticuerpos de tipo IgM e IgG se presentan en el suero hasta una y dos semanas después de la vacunación, respectivamente. Los anticuerpos IgM desaparecen del suero a los 60 días, mientras que los anticuerpos IgG persisten en el suero de por vida (WHO 1993). Además, se ha reportado que los anticuerpos secretores de tipo IgA se presentan en las mucosas gastrointestinales hasta dos o seis semanas después de la vacunación (Ouzilou et al., 2002).

Se observó que ninguno de los ratones vacunados con la vADN1-PV o con la vADN2-PV sobrevivió al reto viral. Todos los ratones vacunados manifestaron parálisis y muerte después de

haber sido retados con poliovirus silvestre tipo I. Lo anterior indica que ninguna de las vacunas de ADN indujo la generación de una respuesta inmune protectora en contra del poliovirus.

A pesar de que ninguna de las vacunas de ADN confirió protección, se observó que los ratones vacunados generaron anticuerpos neutralizantes en contra del poliovirus. Se observó que el título máximo de anticuerpos neutralizantes de los ratones vacunados con la vADN2-PV (log 2.5) fue mayor que el observado con la vADN1-PV (log 2). Sin embargo, los títulos de anticuerpos neutralizantes observados en los ratones del control positivo fueron dos veces más altos que los observados en los ratones vacunados (log 4). La diferencia en el título de anticuerpos entre los ratones vacunados y los ratones del control positivo probablemente se debe a que los últimos fueron inoculados con el poliovirus completo. Así, el poliovirus pudo generar una infección productiva en los ratones y éstos generaron una respuesta inmune en contra del poliovirus que consistió principalmente en la generación de anticuerpos neutralizantes en contra de todo el virus. En cambio, en los ratones vacunados, se desconoce que sucede con las proteínas expresadas codificadas por los plásmidos que constituyen las vacunas de ADN. De esta manera, aunque se generen anticuerpos neutralizantes, posiblemente éstos no se generen en títulos suficientes para controlar y eliminar una infección *in vivo* por poliovirus.

También, se observó que la capacidad neutralizante de los anticuerpos observada *in vitro* no correlacionó con el tiempo de supervivencia observado en el reto viral. En los ensayos de neutralización *in vitro* los sueros de los ratones vacunados con la vADN2-PV presentaron un mayor título de anticuerpos que los sueros de los ratones vacunados con la vADN1-PV. En cambio, en el reto viral se observó que el 45% de los ratones vacunados con la vADN1-PV y ninguno de los ratones vacunados con la vADN2-PV sobrevivió hasta seis días después del reto viral.

Lo anterior podría sugerir que la vADN1-PV tiene un efecto inmunogénico que prolonga la vida de los ratones durante un período corto después del reto viral. Posiblemente, las poliproteínas codificadas por el plásmido que compone la vADN1-PV, pudieran tener un efecto más inmunogénico que el conjunto de proteínas expresadas por el cocktail de plásmidos que componen la vADN2-PV. Así, la respuesta inmune inducida en contra del poliovirus en los ratones vacunados con la vADN1-PV prolongaría el tiempo de vida de los ratones, pero no sería suficiente para controlar y eliminar la infección, por lo que los ratones morirían.

En el caso de la vADN2-PV, las proteínas de cápside VP1, VP2, VP3 y VP4 codificadas por el conjunto de plásmidos que constituyen la vacuna podrían ser procesadas o degradadas rápidamente. En caso de que las proteínas de cápside expresadas individualmente fueran procesadas, los epítopes de células T contenidos en las proteínas de cápside favorecerían la generación de una respuesta inmune celular (Leclerc et al., 1991). Sin embargo, es necesario analizar distintos parámetros de la respuesta inmune para considerar esta posibilidad. En caso de que las proteínas de cápside expresadas fueran degradadas rápidamente, posiblemente su vida media en los ratones sería insuficiente para inducir la generación de una respuesta inmune protectora en contra del poliovirus. Como se mencionó anteriormente, las proteínas de la cápside se estabilizan cuando se autoensamblan entre sí. Sin embargo, es necesario realizar estudios para determinar si esto sucede en los ratones vacunados.

Otra posibilidad es que la cepa murina transgénica utilizada genere una respuesta inmune de mucosas limitada. Aún no se ha estudiado la respuesta inmune en mucosas generada por ratones de la cepa cPVR (Crotty et al., 2002). En este estudio, solamente se analizó la capacidad de neutralización de los anticuerpos séricos, pero se ha observado que la respuesta inmune de mucosas es diferente a la respuesta inmune sistémica: la protección conferida por los anticuerpos secretores no siempre corresponde a la protección conferida por los anticuerpos séricos (Fiore et al., 1997). La relación de niveles protectores entre anticuerpos séricos y anticuerpos secretores aún no se ha determinado, pero se sabe que los anticuerpos secretores son suficientes para impedir la infección por poliovirus (WHO 1993). Además, existe evidencia de que la generación de anticuerpos secretores en contra de los sitios antigénicos inmunodominantes no es un requisito para generar una respuesta inmune protectora en contra del poliovirus en las mucosas (Fiore et al., 1997).

CONCLUSIONES

- Las células transfectadas con el plásmido pVP4-1, que constituye la vADN1-PV, expresaron dos proteínas de 105 y 85 kDa. Sin embargo, como el plásmido pVP4-1 no contiene el gen que codifica la proteasa que procesa a la poliproteína viral que contiene las cuatro proteínas de la cápside, es probable que la poliproteína sea expresada pero que no sea procesada como ocurre normalmente en una infección por poliovirus. Existen otras posibilidades que podrían explicar la presencia de las dos especies distintas de poliproteínas observadas son: la degradación de las proteínas virales por proteasas celulares y la generación de productos incompletos o aberrantes de la traducción.
- La expresión de la proteína verde fluorescente por células transfectadas con los plásmidos pVP1-GFP, pVP2-GFP, pVP3-GFP y pVP4-GFP que constituyen los plásmidos de la vADN2-PV fusionados a la proteína verde fluorescente, sugiere fuertemente que los plásmidos anteriores probablemente expresan las proteínas VP1, VP2, VP3 y VP4.
- Ninguna de las vacunas de ADN generó una respuesta inmune protectora en contra de poliovirus. Sin embargo, es necesario considerar las limitaciones de los ratones de la cepa cPVR, como son la vía de inoculación y la capacidad de generar una respuesta inmune sistémica y de mucosas. También, es necesario considerar la respuesta inmune innata en la protección contra el poliovirus.

PERSPECTIVAS

- Analizar la respuesta inmune de mucosas y la respuesta inmune celular inducida por las vacunas de ADN.
- Determinar si los sueros de los ratones vacunados contienen anticuerpos específicos en contra de poliovirus mediante ensayos de ELISA.
- Probar distintas vías de inoculación para favorecer la inducción de una mejor respuesta inmune humoral.
- Generar anticuerpos específicos en contra de cada una de las proteínas de la cápside para favorecer el reconocimiento específico de cada una de ellas.
- Construir un plásmido que contenga los cuatro genes que codifican las proteínas de la cápside de poliovirus y el gen que codifica la proteasa responsable del procesamiento de las proteínas de la cápside (3C^{pro}).
- Determinar si las proteínas de la cápside se autoensamblan *in vitro* y forman cápsides vacías.
- Explorar los distintos mecanismos propuestos para explicar la presencia de las dos proteínas virales observadas en el ensayo de Western blot.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

REFERENCIAS

1. Alexander, J. P., Gary, H. E., Pallansch, M. A. (1997). Duration of poliovirus excretion and its implications for acute flaccid paralysis surveillance: a review of the literature. *J Infect Dis* 175, S176-S182.
2. Ansardi, D. C., Morrow, C. D. (1995). Amino acid substitutions in the poliovirus maturation cleavage site affect assembly and result in accumulation of provirions. *J Virol* 69, 1540-1547.
3. Ansardi, D. C., Porter, D. C., Morrow, C. D. (1991). Coinfection with recombinant vaccinia viruses expression poliovirus P1 and P3 proteins results in a polyprotein processing and formation of empty capsid structures. *J Virol* 65, 2088-2092.
4. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., Struhl, K. (1998). *Current protocols in molecular biology*, John Wiley & Sons, Inc., USA.
5. Blume, S., Geesink, I. (2000). A brief history of polio vaccines. *Science* 288, 1593-1594.
6. Brautigam, S., Snezhkov, E., Bishop, D. H. (1993). Formation of poliovirus-like particles by recombinant baculoviruses expressing the individual VP0, VP3 y VP1 proteins by comparison to particles derived from the expressed poliovirus protein. *Virology* 192, 512-524.
7. Buisman A. M., Sonsma, J. A. J., Kimman, T. G. Kimman, Koopmans, M. P. G. (2000). Mucosal and systemic immunity against poliovirus in mice transgenic for the poliovirus receptor: the poliovirus receptor is necessary for a virus-specific mucosal IgA response. *J Infect Dis* 181, 815-23.
8. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). (2002). From the Centers for Disease Control and Prevention. Acute flaccid paralysis associated with circulating vaccine-derived poliovirus-Philippines, 2001. *JAMA* 287, 311.
9. Cherkasova E. A., Korotkova, E. A., Yakovenko, M. L., Ivanova, O. E., Ereemeeva, T. P., Chumakov, Agol, V. I. (2002). Long-term circulation of vaccine-derived poliovirus that causes paralytic disease. *J Virol* 76, 6791-6799.

10. Chiba, Y., Kobayashi, M., Chosa, T., Yamamoto, T., Endo, K., Shimizu, H., Li, L., Wen-Bo, X., Li-Bi, Z. (2003). Molecular epidemiology of type 2 vaccine-associated paralytic poliomyelitis in China. *Jpn J Infect Dis* 56, 181-183.
11. Chitsike, I., van Furth, R. (1999). Paralytic poliomyelitis associated with live oral poliomyelitis vaccine in child with HIV infection in Zimbabwe: case report. *Br Med J* 318, 841-843.
12. Crotty, S., Hix, L., Sigal, L. J., Andino, R. (2002). Poliovirus pathogenesis in a new poliovirus receptor transgenic mouse model: age-dependent paralysis and a mucosal route of infection. *J Virol* 83, 1707-1720.
13. Deatly, A. M., Taffs, R. E., McAuliffe, J. M., Nawoschik, S.P., Coleman, J. W., McMullen, G., Weeks-Levy, C., Johnson, A. J., Racaniello, V. R. (1998). Characterization of mouse lines transgenic with the human poliovirus receptor gene. *Microb Pathog* 25, 43-64.
14. Dragunsky, E., Nomura, T., Karpinski, K., Furesz, J., Wood, D. J., Pervikov, Y., Abe, S., Kurata, T., Vanlooche, O., Karganova, G., Taffs, R., Heath, A., Ivshina, A., Levenbook, I. (2003). Transgenic mice as an alternative to monkeys for neurovirulence testing of live oral poliovirus vaccine: validation by a WHO collaborative study. *Bull World Health Organ* 81, 251-260.
15. Fiore, L., Ridolfi, B., Genovese, D., Buttinelli, G., Lucioli, S., Lahm, A., Ruggeri, F. M. (1997). Poliovirus type 1 neutralization epitopes recognized by immunoglobulin A monoclonal antibodies. *J Virol* 71, 6905-6912.
16. Flint, S. J., Enquist, L. W., Krug, R. M., Racaniello, V. R., Skalka, A. M. (2000). Principles of virology: molecular biology, pathogenesis, and control. Washington: ASM Press, 664-675, 750-751.
17. Food and Drug Administration (FDA) (1996). Points to consider on plasmid DNA vaccines for preventive infectious diseases indications (Docket no. 96N-0400), Center for Biologics Evaluation and Research (CBER).
18. Georgescu, M. M., Balanant, J., Macadam, A., Otelea, D., Conbiescu, M., Conbiescu, A. A., Crainic, R., Delpeyroux, F. (1997). Evolution of the sabin type 1 poliovirus in humans:

- characterization of strains isolated from patients with vaccine-associated paralytic poliomyelitis. *J Virol* 71, 7758-7768.
19. Gurunathan, S., Klinman, D. M., Sedeer, R. A. (2000). DNA vaccines: immunology, application and optimization. *Annu Rev Immunol* 18, 927-974.
 20. Harber, J. J., Bradley, J., Anderson, C. W., Wimmer, E. (1991). Catalysis of poliovirus VP0 maturation cleavage is not mediated by serine 10 of VP2. *J Virol* 65, 326-334.
 21. Herremans, T., Reimerink, J. H., Kimman, T. G., van der Avoort, H. G. A. M., Koopmans, M. P. G. (2000). Antibody responses to antigenic sites 1 and 3 of serotype poliovirus after vaccination with oral live attenuated or inactivated poliovirus vaccine and after natural exposure. *Clin Diagn Lab Immunol* 7, 40-44.
 22. Hindiyeh, M., Li, Q. H., Basavappa, R., Hogle, J. M., Chow, M. (1999). Poliovirus mutants at histidine 195 of VP2 do not cleave VP0 into VP2 and VP4. *J Virol* 73, 9072-9079.
 23. Hovi, T., Cantell, K., Huovilainen, A., Kinnunen, E., Kuronen, T., Lapinleimu, K., Poyry, T., Roivainen, M., Salama, N., Stenvik, M., Silander, A., Thoden, C.-J., Salminen, S., Weckstrom, P. (1986). Outbreak of paralytic poliomyelitis in Finland: widespread circulation of antigenically altered poliovirus type 3 in a vaccinated population. *Lancet* i, 1427-1432.
 24. Howley, P. M., Griffin, D. E., Lamb, R. A., Martin, M. A., Roizman, B., Straus, S. E., Knipe, D. M., Fields, B. N. (2001). *Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 4th ed., 685-775. <http://www.who.ch/programmes/gpv/gEnglish/avail/gpvcatalog/catlog1.html>
 25. Jarvis, T. C., Kirkegaard, K. (1992). Poliovirus RNA recombination: mechanistic studies in the absence of selection. *EMBO* 11, 3135-3145.
 26. Kew, O. M., Morris-Glasgow, V., Landaverde, M., Burns, C., Shaw, J., Garib, Z., Andre, J., Blackman, E., Freeman, C. J., Jorba, J., Sutter, R., Tambini, G., Venczel, L., Pedreira, C., Laender, F., Shimizu, H., Yoneyama, T., Miyamura, T., van Der Avoort, H., Oberste, M. S., Kilpatrick, D., Cochi, S., Pallansch, M., de Quadros, C. (2002). Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science* 296, 356-359.

27. Kew, O. M., Sutter, R. W., Nottay, B. K., McDonough, M. J., Prevots, D. R., Quick, L., Pallansch, M. A. (1998). Prolonged replication of a type 1 vaccine-derived poliovirus in an immunodeficient patient. *J Clin Microbiol* 36, 2893-2899.
28. Kew, O. M., Wright, P. F., Agol, V. I., Delpeyroux, F., Shimizu, H., Nathanson, N., Pallansch, M. A. (2004). Circulating vaccine-derived polioviruses: current state of knowledge. *Bull World Health Organ* 82, 16-23.
29. Korotkova, E. A., Park, R., Cheraskova, E. A., Lipskaya, G. Y., Chumakov, K. M., Feldman, E. V., Kew, O. M., Agol, V. I. (2003). Retrospective analysis of a local cessation of vaccination against poliomyelitis: a possible scenario for the future. *J Virol* 77, 12460-12465.
30. Leclerc, C., Deriaud, E., Mimic, V., van der Werf, S. (1991). Identification of a T-cell epitope adjacent to neutralization antigenic site 1 of poliovirus type 1. *J Virol* 65, 711-718.
31. Liu, M. A. (2003). DNA vaccines: a review. *J Intern Med* 253, 402-410.
32. Martin, J., Crossland, G., Wood, D. J., Minor, P. D. (2003). Characterization of formaldehyde-inactivated poliovirus preparations made from live-attenuated strains. *J Gen Virol* 84, 1781-1788.
33. Martin, J., Dunn, G., Hull, R., Patel, V., Minor, P.D. (2000). Evolution of the sabin strain of the type 3 poliovirus in an immunodeficient patient during the entire 637-day period of virus excretion. *J Virol* 74, 3001-3010.
34. Martin, J., Ferguson, G. L., Wood, D. J., Minor, P. D. (2003). The vaccine origin of the 1968 epidemic of type 3 poliomyelitis in Poland. *Virology* 278, 42-49.
35. Minor, P. D. (1987). Growth and assay of picornaviruses. *Virology a practical approach*. IRL Press, UK.
36. Minor, P. D. (1992). The molecular biology of poliovaccines. *J Gen Virol* 73, 3065-3077.
37. Minor, P. D. (1999). Poliovirus vaccination: current understanding of poliovirus interactions in humans and implications for the eradication of poliomyelitis. *Exp Rev Molec Biol* 1-17.
38. Minor, P. D., Ferguson, M., Evans, D. M. A., Almond, J. W., Icenogle, J. P. (1986). Antigenic structure of poliovirus of serotypes 1, 2 and 3. *J Gen Virol* 67, 1283-1291.

39. Minor, P.D., Dunn, G. (1988). The effect of sequences in the 5' non-coding region on the replication of polioviruses in the human gut. *J Gen Virol* 69, 1091-1096.
40. Molla, A., Paul, A. V., Wimmer, E. (1991). Cell-free, de novo synthesis of poliovirus. *Science* 254: 1647-1651.
41. Nagata, N., Iwasaki, T., Ami, Y., Sato, Y., Hatano, I., Harashima, A., Suzaki, Y., Yoshii, T., Hashikawa, T., Sata, T., Horiuchi, Y., Koike, S., Kurata, T., Nomoto, A. (2004). A poliomyelitis model through mucosal infection in transgenic mice bearing human poliovirus receptor, TgPVR21. *Virology* 321: 87-100.
42. Nomoto, A., Arita, I. (2002). Eradication of poliomyelitis. *Nat Immunol* 3, 205-208.
43. Ouzilou, L., Caliot, E., Pelletier, I., Prevost, M. C., Pringault, E., Colbere-Garapin, F. (2002). Poliovirus transcytosis through M-like cells. *J Gen Virol* 8, 32177- 32182.
44. Poyry, T., Kinnunen, L., Kapsenberg, J., Kew, O., Hovi, T. (1990). Type 3 poliovirus/Finland/1984 is genetically related to common Mediterranean strains. *J Gen Virol* 71, 2535-2541.
45. Ren, R., Constantini, F., Gorgacz, E. J., Lee, J. J., Racaniello, V. R. (1990). Transgenic mice expressing a human poliovirus receptor: a new model for poliomyelitis. *Cell* 63, 353-362.
46. Rombaut, B., Jore, J. P. M. (1997). Immunogenic, non-infectious polio subviral particles synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Virol* 78, 1829-1832.
47. Rousset, D., Rakoto-Andrianarivelo, M., Razafindratsimandresy, R., Randriamanalina, B., Guillot, S., Balanant, J., Mauclere, P., Delpeyroux, F. (2003). Recombinant vaccine-derived poliovirus in Madagascar. *Emerg Infect Dis* 9, 885-887.
48. Sabin, A. B., Boulger, L. R. (1973). History of Sabin attenuated poliovirus oral live vaccine strains. *J Biol Stand* 1, 115-118.
49. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd edn., Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
50. Strebel, P. M., Sutter, R. W., Cochi, S. L., Biellik, R. J., Brink, E. W., Kew, O. M., Pallansch, M. A., Orenstein, W. A., Hinman, A. R. (1992). Epidemiology of poliomyelitis in

- the United States one decade after the last reported case of indigenous wild virus-associated disease. *Clin Infect Dis* 14, 568-579.
51. Vrijzen, R., Mosser, A., Boeye, A. (1993). Postadsorption neutralization of poliovirus. *J Virol* 67, 3126-3133.
 52. Wells, V. R., Plotch, S. J., DeStefano, J. J. (2001). Determination of the mutation rate of poliovirus RNA-dependent RNA polymerase. *Virus Res* 74, 119-132.
 53. Wood, D. J., Sutter, R. W., Dowdle, W. R. (2000). Stopping poliovirus vaccination after eradication: issues and challenges. *Bull World Health Organ* 78, 347-357.
 54. World Health Organization (WHO) (1993). The immunological basis for immunization series, Module 6: poliomyelitis, global programme for vaccines and immunization, expanded programme on immunization.
 55. World Health Organization (WHO) (2003). Report of the eighth meeting of the technical consultative group (TCG) on the global eradication of poliomyelitis. Geneva, 24-25 April.
 56. Yang, C.-F., Naguib, T., Yang, S.-J., Nasr, E., Jorba, J., Ahmed, N., Campagnoli, R., van der avoort, H., Shimizu, H., Yoneyama, T., Miyamura, T., Pallansch, M., Kew, O. (2003). Circulation of endemic type 2 vaccine-derived poliovirus in Egypt from 1983 to 1993. *J Virol* 77, 8366-8377.
 57. Yoneyama, T., Yoshida, H., Shimizu, H., Yoshii, K., Nagata, N., Kew, O., Miyamura, T. (2001). Neurovirulence of sabin 1-derived polioviruses isolated from an immunodeficient patient with prolonged viral excretion. *Dev Biol Basel* 105, 93-98.
 58. Zhang, S., Racaniello, V. R. (1997). Expression of the poliovirus receptor in intestinal epithelial cells is not sufficient to permit poliovirus replication in the mouse gut. *J Virol* 71, 4915-4920.