00377

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

"RESPUESTA INMUNE DE UNA VACUNA GÉNICA CONTRA EL VIRUS DE LA RABIA EMPLEANDO *Salmonella typhimurium* SL3261 COMO VECTOR Y CON LA AYUDA DE LA PNEUMOLISINA DE *Streptococcus pneumoniae*"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

BIOL. MÓNICA SALAS ROJAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ ÁLVARO AGUILAR SETIÉN

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLOGICAS
COORDINACIÓN

MÉXICO, D. F. SEPTIEMBRE 2005

M349111

Universidad Nacional Autónoma de México
UNAM
Biblioteca Central
Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

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.

UNAM
POSGRADO
Ciencias Biológicas

COORDINACIÓN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Mónica Salas Rojas
FECHA: 27-Septiembre-05
FIRMA:

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
P r e s e n t e

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 27 de junio del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Salas Rojas Mónica** con número de cuenta **93261465** con la tesis titulada: **"Respuesta inmune de una vacuna génica contra el virus de la rabia empleando *Salmonella typhimurium* SL3261 como vector y con la ayuda de la pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae*"**, bajo la dirección del(a) **Dr. José Alvaro Aguilar Setién.**

Presidente:	Dra. Ana Flisser Steinbruch
Vocal:	Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales
Secretario:	Dr. José Alvaro Aguilar Setién
Suplente:	Dr. Armando Isibasi Araujo
Suplente:	Dr. César Raúl González Bonilla

Sin otro particular, quedo de usted.

A t e n t a m e n t e
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 31 de agosto del 2005

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Este Proyecto se realizó en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología del Centro Médico Nacional "Siglo XXI", en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional "La Raza" y en el Departamento de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México. Bajo la tutoría del Dr. J. Álvaro Aguilar Setién y con la colaboración de los doctores Cesar R. González Bonilla y Rogelio A. Alonso Morales.

El proyecto fue financiado por el Instituto Mexicano del Seguro Social, proyecto número IMSS-2004/002. Las becas de apoyo para la realización de este trabajo fueron otorgadas por el Instituto Mexicano del Seguro Social y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A mis padres, gracias por darme su ejemplo, sus valores y sobretodo por estar a mi lado.

Erik y Tania...gracias.

A la familia Arcos-Rojas, gracias por permitirme ser parte de ustedes y apoyarme siempre.

A Adolfo Calderón Zarza, eres un gran motivo para salir adelante. Gracias por siempre estar ahí.

Dedicada al Doctor Roberto Kretschmer Schmid

Por su ejemplo, apoyo y dedicación.
Por que siempre se dedicó a educar a las personas y a compartir su cultura para hacernos crecer.
Por ser un gran guia.

Por creer en mí...

Muchas gracias

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. J. Álvaro Aguilar Setién por su apoyo y dirección en la realización de este trabajo.

Al Dr. César R. González Bonilla por abrirme las puertas de la UIM en Inmunología e Infectología, por sus consejos y apoyo para realización del trabajo.

A los Doctores Rogelio A. Alonso Morales, Amando Isibasi Araujo y Ana Flisser Steinbruch por sus valiosas aportaciones al trabajo.

A los Biólogos Leticia Ramos y Leonardo Perea por su apoyo y compañerismo, así como a todo el personal de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología.

A los M en C Alicia Ocaña y Rosendo Luría, al Químico Francisco Osorio y todo el personal de la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología por su ayuda, asesoría y colaboración.

A mis amigos –Luz, Móny V., Pedro, Móny P, Javier, David, Héctor, Mario, Sandy, Sara, Ericka, Rosendo y Pako- no se necesita estar cerca para saber que siempre están a mi lado.

ÍNDICE

RESUMEN 10

INTRODUCCIÓN 11

Rabia 11

Antígenos virales 13

Proteína G 13

Panorama epidemiológico 15

Vacunación antirrábica 17

Vacunas de DNA 19

Optimización de las vacunas génicas 23

Vectores bacterianos 25

Salmonella como acarreador 26

Empleo de citolisinas 27

Pneumolisina 28

ANTECEDENTES 29

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA 31

HIPÓTESIS 31

OBJETIVOS 31

General 31

Particulares 31

Metas 32

MATERIAL Y MÉTODOS 33

Ingeniería genética 33

Cepas bacterianas empleadas 33

Plásmidos empleados 33

Células electrocompetentes 36

Electroporación de las bacterias 37

Curva de crecimiento 38

Inducción de proteínas 38

Cuantificación de proteínas 39
Ensayos de hemólisis 39
Cultivos celulares 40
Cultivo de macrófagos murinos J774 40
Cultivo de células de neuroblastoma murino CCL-131 40
Ensayos de transfección y co-infección de la línea celular J774 40
Detección de la proteína reportera en los macrófagos J774 transfectados 42
1. Citometría de flujo 42
2. Microscopia confocal 42
Inmunización de ratones híbridos F1 C57xCD1 43
Determinación de anticuerpos contra *Salmonella typhimurium* SL3261 44
Determinación del título de anticuerpos antirrábicos neutralizantes 45
Análisis estadístico 47
RESULTADOS 47
Transformación de *Salmonella typhimurium* SL3261 47
Curvas de crecimiento 48
Expresión y actividad de la pneumolisina recombinante 50
Transfecciones y co-infecciones *in vitro*, empleando la línea celular de macrófagos murinos J774 54
Transfecciones con liposomas 54
Ensayos de co-infección, Salmonella typhimurium como vector de transfección 55
Vacunación oral de los ratones F1 C57xCD1 con las mezclas de bacterias de *Salmonella typhimurium* SL3261 transformadas con distintos plásmidos 58
1. Anticuerpos contra Salmonella typhimurium SL3261 58
2. Anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia 60
DISCUSIÓN 63

CONCLUSIONES 68
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 70

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1 12
Figura 2 12
Figura 3 14
Figura 4 16
Cuadro 1 21
Figura 5 22 y 23
Figura 6 33
Figura 7 34
Figura 8 35
Figura 9 36
Figura 10 41
Figura 11 44
Figura 12 48
Figura 13 48
Figura 14 49
Figura 15 50
Figura 16 51
Figura 17 52
Figura 18 53
Figura 19 53
Figura 20 54
Figura 21 55
Figura 22 55
Cuadro 2 56

Figura 23 57
Figura 24 57
Cuadro 3 58
Figura 25 59
Cuadro 4 60
Figura 26 61

RESUMEN

La rabia es una encefalomielitis fatal que se transmite al hombre por mordida de un animal infectado. En México se aplican más de 10 millones de dosis en las campañas anuales de vacunación canina para controlar esta enfermedad. Cepas atenuadas de *Salmonella* sp. optimizadas con citolisinas se usan como acarreadores en la inmunización con DNA. La hipótesis es que la inmunización oral con *Salmonella typhimurium* SL3261 transformada con el plásmido vacunal mezclada con bacterias que expresan la pneumolisina producirá un nivel de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia comparable a la inyección intramuscular del plásmido vacunal sólo. El objetivo es evaluar el nivel de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia utilizando *S. typhimurium* SL3261 como acarreador del plásmido vacunal. Los ensayos *in vitro* demostraron que *S. typhimurium* es capaz de liberar un plásmido reportero sin necesidad de la pneumolisina y cuando se emplea esta proteína su efecto es mejor a tiempos largos, 72 horas. Con la vacunación oral de los ratones híbridos C57xCD1 se encontró que se induce un nivel protector de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia, aunque es menor al informado por vía intramuscular. Cuando se emplea la pneumolisina, en los ensayos *in vivo*, el título de anticuerpos contra el virus de la rabia se mantuvo durante más tiempo, 90 días. *S. typhimurium* SL3261 fue capaz de transportar y liberar los plásmidos reportero y vacunal, tanto *in vitro* como *in vivo*. La aplicación oral de la vacuna es una gran ventaja, quedando abierta la posibilidad de usarla en cebos para fauna silvestre.

INTRODUCCIÓN

Rabia

El virus de la rabia pertenece al orden de los Mononegavirales, familia Rhabdoviridae y género *Lyssavirus*. Dentro de este género se encuentran siete serogenotipos que fueron definidos por identificación con anticuerpos monoclonales hacia la glicoproteína, además de la alineación y comparación de secuencias de la nucleoproteína viral (Badrane *et al.*, 2001). Los representantes de cada serogenotipo son: 1, *virus de la Rabia*; 2, *virus Lagos bat*; 3, *virus Mokola*; 4, *virus Duvenhage*; 5, *virus EBL 1* (*European bat lyssavirus*); 6, *virus EBL 2*; y 7, *ABL* (*Australian bat lyssavirus*) (figura 1). El genoma del virus de la rabia es de RNA linear no segmentado, de polaridad negativa (figura 2), mide 12 kilobases (kb) aproximadamente, y contiene cinco genes que codifican para las cinco proteínas que lo conforman (Tordo, 1993):

- La glicoproteína (G), de 70 kiloDaltones (kDa) que esta glicosilada y acilada con ácido palmítico, se encuentra anclada a la membrana, forma trímeros que constituyen las espículas salientes, y es la más antigénica.
- La proteína de matriz (M o M1), de 25 kDa esta palmitiolada y fosforilada, se encuentra tocando la superficie interna de la membrana del virión uniendo a la proteína G con la proteína N.
- La proteína N es la nucleoproteína o nucleocápside, pesa 57 kDa y forma parte del complejo ribonucleoproteico fosforilado que envuelve al material genómico.
- La proteína L nombrada así por ser la más grande pesa 180 kDa, es la RNA polimerasa del virus y también forma parte del complejo ribonucleoproteico fosforilado.

- La proteína NS (también nombrada como M_2 o P, por fosfoproteína), pesa 38.5 kDa, forma el complejo ribonucleoproteico fosforilado e interviene en la replicación del material genómico viral. Inicialmente fue considerada como no estructural.

El complejo formado por estas tres últimas proteínas es el que da la forma de bala al virión.

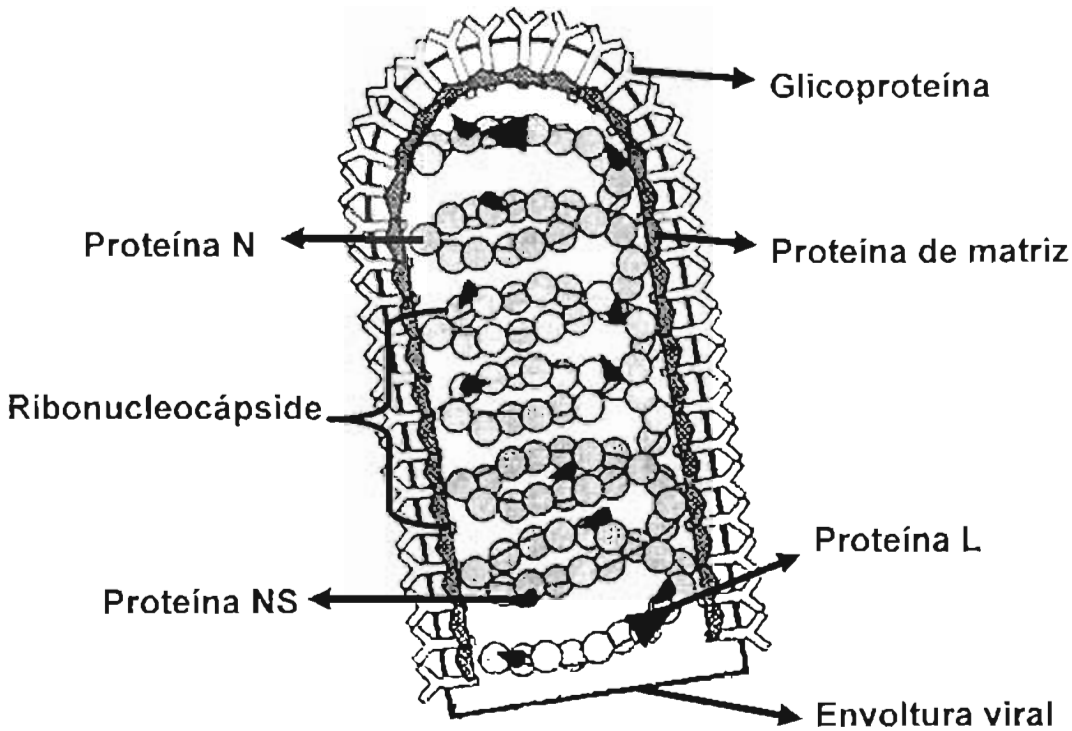


Figura 1. Esquema del virus de la rabia. Modificado de Tordo, 1993.

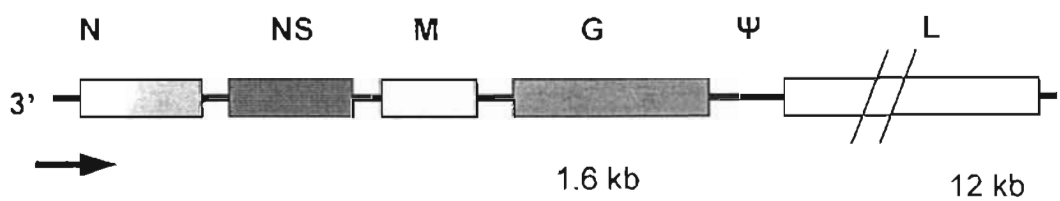


Figura 2. Esquema del genoma del virus de la rabia. Se representan los cinco genes que codifican para las cinco proteínas respectivas: gen N, nucleoproteína; gen NS o P, fosfoproteína; gen M, proteína de matriz; gen G, glicoproteína; gen L codifica para la RNA polimerasa viral, y el pseudogen Ψ. El sentido de la cadena es de 3' a 5' por ser de sentido negativo.

Antígenos virales

Las proteínas que forman al virus de la rabia tienen un papel variado en la respuesta inmunológica. La proteína NS o fosfoproteína, es capaz de inducir la producción de anticuerpos no neutralizantes y células T citotóxicas en ciertas líneas de ratón (Lafon *et al.*, 1985; Dietzschold *et al.*, 1987a; Larson *et al.*, 1991; Larson *et al.*, 1992). La proteína N o nucleoproteína es capaz de estimular la producción de células T cooperadoras, pero no citotóxicas y esta considerada dentro de la familia de los superantígenos (Wiktor *et al.*, 1973; Lafon *et al.*, 1992). La proteína N puede proteger contra el desafío cuando el virus de la rabia se inocula por vía periférica, pero no intracerebral (Dietzschold *et al.*, 1987b; Tollis *et al.*, 1991). Además induce la formación de anticuerpos no neutralizantes (Celis *et al.*, 1988; Ertl, 1989) y puede aumentar la producción de anticuerpos neutralizantes cuando se inyecta junto con la partícula viral inactiva (Ertl *et al.*, 1989; Herzog *et al.*, 1992; Hooper *et al.*, 1994). La proteína M2 o de matriz también induce la formación de anticuerpos no neutralizantes y células T cooperadoras (Dorfman *et al.*, 1994; Bunschoten *et al.*, 1990). Sin embargo, la glicoproteína o proteína G se considera la proteína inmunodominante porque es la única que sobresale de la superficie viral y es la única capaz de formar anticuerpos neutralizantes del virus.

Proteína G

Es una proteína tipo I, tiene el extremo carboxilo intracitoplasmático. Presenta cuatro dominios que, de extremo amino a carboxilo son: 1) el péptido señal con una longitud de 19 aminoácidos (aa); 2) el ectodominio de 439 aa que constituye la parte externa; 3) el dominio transmembranal (21 aa), hidrófobo, que permite el anclaje a la membrana, y 4) el dominio intracitoplásmico (45 aa), hidrófilo (Sokol *et al.*, 1971; Tordo *et al.*, 1980). Las espículas virales están formadas por homotrímeros de glicoproteínas (Delagneua *et al.*, 1981; Gaudin *et*

al., 1995; Dietzschold *et al.*, 1978; Whitt *et al.*, 1991). Esta proteína interviene en la fusión, en el proceso de infección e interactúa con el receptor en las células, además de ser esencial para la formación de nuevos viriones (Bahloul, 1997) (figura 3).

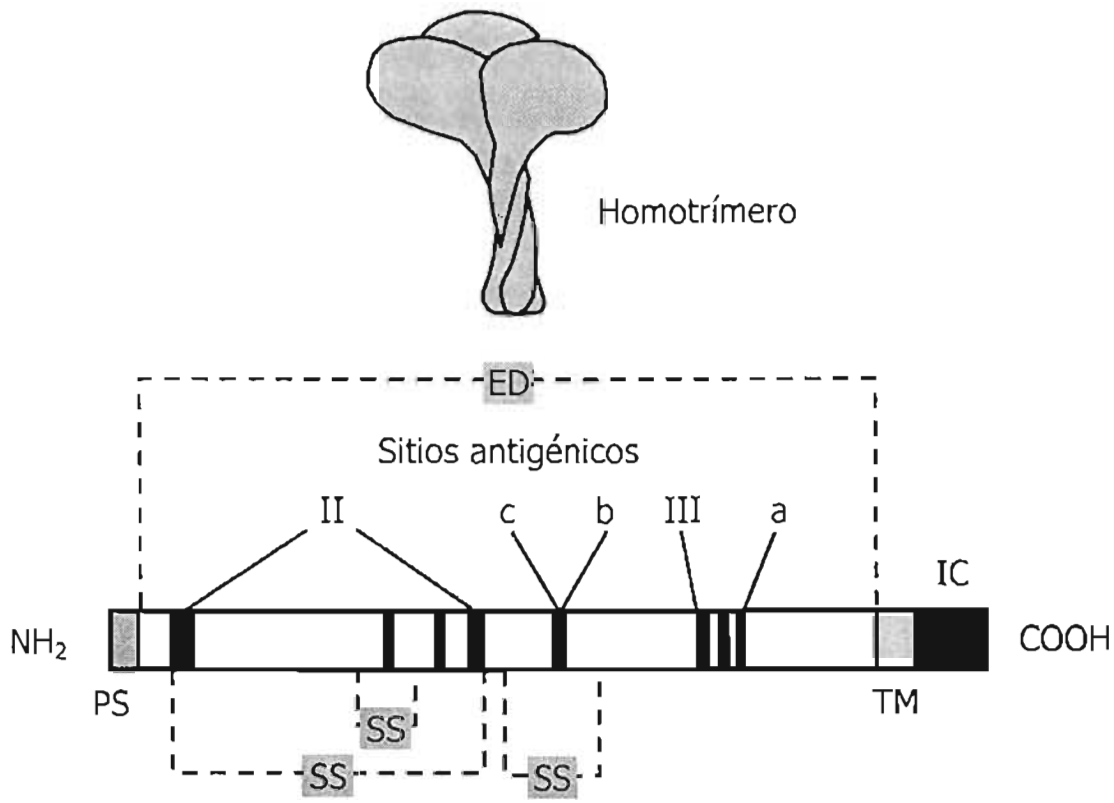


Figura 3. Esquema de la glicoproteína del virus de la rabia. Se representa su posible conformación como homotrímero (arriba), y en una representación lineal se marcan los dominios que la conforman y sus sitios antigénicos (abajo). **PS** péptido señal; **ED** ectodominio; **TM** dominio transmembranal; **IC** dominio intracitoplásmico; **NH_2** extremo amino; **COOH** extremo carboxilo; **SS** puentes disulfuro; sitios antigénicos: **II**, **III**, **a**, **b** y **c**. Modificado de Bahloul, 1997.

La proteína G es la única capaz de inducir la producción de anticuerpos neutralizantes (Wiktor *et al.*, 1973), de células T cooperadoras (Celis *et al.*, 1988; Langrange *et al.*, 1978; Tsiang *et al.*, 1980; MacFarlan *et al.*, 1980; Perrin *et al.*, 1988) y células T citotóxicas (Wiktor *et al.*, 1977; MacFarlan *et al.*, 1986). La proteína G soluble es inmunogénica (Wojczyk *et al.*, 1995; Dietzschold *et al.*, 1983), por lo que ya sea asociada a la partícula viral, en vesículas lipídicas o en

partículas de polisacáridos es protectora e induce la producción de células T cooperadoras y citotóxicas (MacFarlan *et al.*, 1986; Castignolles *et al.*, 1996; Perrin *et al.*, 1985). Esta proteína es capaz de inducir protección contra el virus cuando se inocula por vía intracerebral ó periférica (Perrin *et al.*, 1985; Cox *et al.*, 1977).

Se han reconocido dos sitios antigénicos principales: el sitio antigénico II, que es discontinuo y está formado por los segmentos de los residuos de aminoácidos 34-42 y 198-200 (Prehaud *et al.*, 1988); y el sitio antigénico III, que es continuo, está localizado entre los aminoácidos 330-338 y posee una arginina en la posición 333 importante para la neutralización del virus (Seif *et al.*, 1985), el reconocimiento con el receptor y la invasión del virus a la célula (Dietzschold *et al.*, 1983; Coulon *et al.*, 1989; Badrane *et al.*, 2001). Además presenta otros tres sitios antigénicos (a, b y c) que ayudan al reconocimiento entre las distintas variantes del género (Bahloul, 1997). Aunque la estructura tridimensional de la glicoproteína no se conoce, por estudios de homología, mutantes de escape y desarrollo de plegamiento se ha identificado la importancia y localización de los principales epítopos, deduciendo que primero se empieza a plegar la cola y después la cabeza de la proteína y que los principales sitios quedan por debajo o cerca de la región de la cabeza, además de que la proteína durante su formación adquiere por lo menos tres conformaciones (Gaudin, 1997; Irie *et al.*, 2002; Jonson *et al.*, 2002).

Panorama epidemiológico

El virus de la rabia puede afectar a todos los mamíferos y por esto tiene una distribución mundial. Las especies consideradas como reservorios son perros, zorros, lobos, mapaches, mangostas, zorrillos y el murciélago vampiro (*Desmodus rotundus*), entre otros; los hospederos incidentales pueden ser herbívoros u omnívoros, tal es el caso del ganado y del hombre. Por sus ciclos de transmisión la rabia se divide en urbana y silvestre, el perro es el principal transmisor de la

rabia urbana. La rabia silvestre se puede subdividir en terrestre y aérea, teniendo como reservorios terrestres al zorro, mangostas, mapaches y zorrillos, y el principal reservorio del ciclo aéreo es el murciélago vampiro *D. rotundus.* (Aguilar-Setién y Loza-Rubio, 1999) (figura 4).

Figura 4. Mapa de la República Mexicana donde se muestran los estados en los que se informaron casos positivos a rabia canina hasta el 20 de julio del 2004. Disponible en http://web2.sanasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc1129/.

En el hombre la rabia provoca una encefalomielitis fatal que se transmite, principalmente, por mordida de un animal infectado, siendo el perro responsable del 73.1% de los casos de rabia humana informados para América en el año 2000; a este le sigue el murciélago hematófago *D. rotundus* con el 19.2%. (Organización Panamericana de Salud, 2000). En México ha habido una reducción importante

en los casos de rabia humana presentados, de 60 casos en 1990 a uno en el 2000 (Secretaría de Salud SSA, 2001). Esta tendencia también se encontró en el perro, que en 1990 se informaron 8, 706 casos y en el 2000 llegaron a 261. Este comportamiento es resultado de las campañas de vacunación canina masivas, en las que se aplican alrededor de 14 millones de dosis para poder controlar la enfermedad (Velasco-Villa *et al.*, 2002). Sin embargo los casos relacionados con rabia silvestre han ido en aumento, de 6% (4 de 69 casos) en 1990 a 80% (4 de 5 casos) en el 2000.

En México existen varias especies, tanto terrestres como aéreas, que son reservorios del virus de la rabia en sus diferentes variantes, con 9 de las 11 variantes informadas para América (V1, V3, V4, V5, V7, V8, V9, V10, y V11), esto dificulta el estudio de la epidemiología de la enfermedad en el país, ya que el relieve accidentado y la diversidad de especies hace posible la conservación del virus en vida silvestre; además la invasión de hábitats por el crecimiento poblacional aumenta las posibilidades de contactos en los que el virus se pueda propagar (De Mattos *et al.*, 1996; De Mattos *et al.*, 1999; Díaz *et al.*, 1994; Favi *et al.*, 1999; Loza-Rubio *et al.*, 1999; Warner *et al.*, 1999; Salas-Rojas *et al.*, 2004). De hecho el primer aislamiento de rabia en México (1943) se hizo de un murciélago frugívoro del género *Artibeus* (Baer *et al.*, 1991), lo que indica la importancia de la fauna silvestre en el país y considerar su vacunación, sobretodo porque la rabia urbana se está controlando.

Vacunación antirrábica

La historia de la vacunación comienza en el siglo XIX con Luis Pasteur, el 6 de julio de 1885 fue la primera vacunación de un ser humano, Joseph Meister, que fue mordido por un perro infectado, en ese mismo año se publicó la primera aplicación de un tratamiento post-exposición en humanos; además también demostró que la saliva era la fuente de infección del virus, que el tejido nervioso

infectado puede transmitir la enfermedad y que el virus puede ser modificado a través de pases sucesivos en animales, en éste caso conejos (Pasteur *et al.*, 1881; Pasteur, 1885).

Pastoret *et al.* (1997) hicieron una recopilación sobre la historia de la vacunación antirrábica, las distintas cepas empleadas y la epidemiología. En la vacunación antirrábica se han empleado casi todos los tipos de vacunas, iniciando con las producidas por Pasteur en la década de 1880, que se basaban en la inyección de una suspensión de tejido nervioso infectado con virus fijo e inactivado por desecación. A principios del siglo pasado se usó la vacuna tipo Fermi, que también consistió en tejido nervioso infectado que era parcialmente inactivado con fenol, el tejido esta vez provenía de borregos o cabras; en 1911 se desarrollaron las vacunas tipo Semple (Semple, 1911) en las que el virus estaba completamente inactivado con fenol, así se disminuyó el riesgo de un accidente post-vacunación, pero esta latente el riesgo de una reacción hacia los otros componentes del sistema nervioso que también iban en la vacuna, por ejemplo la mielina; por esto en 1955, Fuenzalida y Palacios produjeron la vacuna antirrábica en ratones lactantes e inactivaron el virus con B-propiolactona (Pastoret *et al.*, 1997). Hasta 1980 éste era el tipo de vacuna más empleado, y aún en la actualidad en algunos países en desarrollo se sigue aplicando (Pastoret *et al.*, 1997).

Después se desarrollaron vacunas que aumentaban la pureza del antígeno sin poner en riesgo la inmunogenicidad y evitando las reacciones de hipersensibilidad por componentes secundarios de la vacuna, como las vacunas desarrolladas en huevos embrionados de pato y las vacunas producidas en cultivos celulares (VERO y células diploides de humano o mono, entre otras líneas), sin embargo estas vacunas son de producción costosa y de manejo delicado (requieren de cadena fría), lo que las hace de difícil acceso para países en desarrollo o zonas aisladas (Pastoret *et al.*, 1997).

Por último, y sobre todo para la aplicación en fauna silvestre, se desarrollaron vacunas recombinantes, en las que se insertó el gen de la glicoproteína rábica en el virus vaccinia como vector (Wiktor *et al.*, 1984) y también las vacunas de sub-unidades virales (proteína G pura o fragmentos de esta). Estas vacunas tienen un uso masivo en países del este de Europa, Canadá y EUA, su producción onerosa también las hace de difícil acceso para países en desarrollo (Pastoret *et al.*, 1997). En la medicina veterinaria se aplican vacunas de virus inactivados o atenuados para los tratamientos preventivos con al fin de controlar la enfermedad; sin embargo, para uso humano sólo están permitidas las vacunas de virus inactivado, para de evitar el riesgo de cualquier accidente (Pastoret *et al.*, 1997).

Vacunas de DNA

La vacunas de DNA se basan en la observación de que la inoculación directa de DNA plasmídico resulta en la expresión del antígeno deseado (Tang *et al.*, 1992). Antes de la década de 1990 empezaron los trabajos de aplicación de vacunas basadas en DNA, pero esto se hacia por medio de acarreadores como liposomas, complejos de proteínas y otros compuestos (Gurunathan *et al.*, 2000), y fue hasta 1990 cuando Wolff *et al.* demostraron que la inyección de DNA plasmídico puro conduce a la expresión de las proteínas heterólogas codificadas por el DNA en las fibras musculares. A partir de entonces se han publicado diversos trabajos sobre la respuesta inmune inducida por la inyección de los plásmidos que codifican para antígenos de diversos agentes patógenos (Tang *et al.*, 1992), entre los primeros se encuentran los trabajos de Ulmer *et al.* (1993) y Robinson y colaboradores (1993), que demostraron que una vacuna de DNA protege tanto a ratones como a pollos, respectivamente, de un reto con virus de influenza.

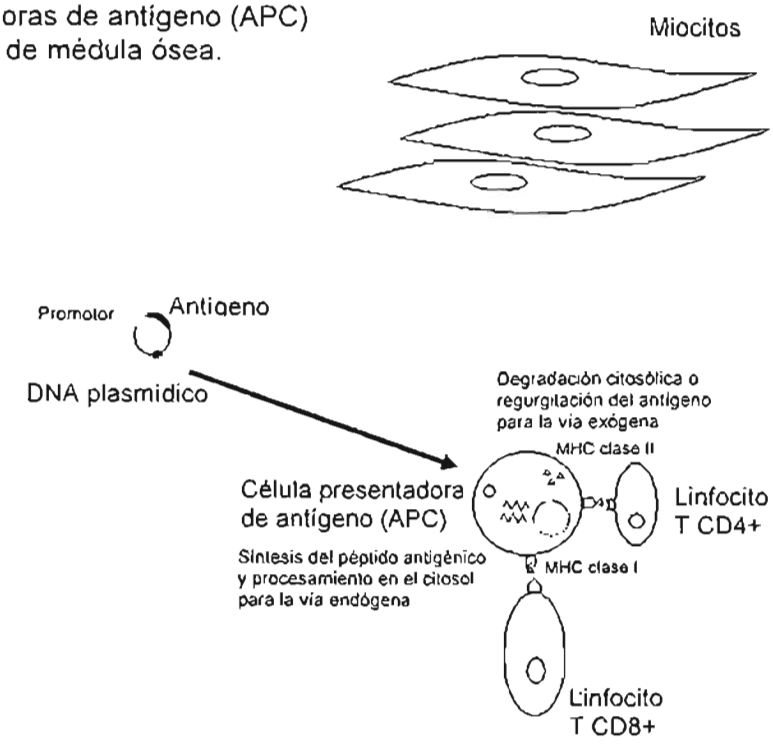
Las vacunas génicas o de DNA presentan varias ventajas sobre las vacunas tradicionales (atenuadas, inactivadas, de sub-unidades o recombinantes), entre las que están las siguientes: 1) pueden acarrear genes que codifican para una o más proteínas antigénicas de uno o varios agentes patógenos, además, de incluir genes que aumentan la respuesta inmune; 2) generan respuesta inmune humoral y celular, ya que el antígeno puede ser procesado por la vía endógena y presentado por el complejo principal de histocompatibilidad clase I (MHC-I), activando así células T citotóxicas (Tc), y por la vía exógena al ser secretado y fagocitado del medio o células que expresan la molécula, presentarse por medio del complejo principal de histocompatiblidad clase II (MHC-II) para activar células T cooperadoras (Th), que iniciarán la activación para la formación de anticuerpos; 3) el proceso de fabricación es más barato, comparado con las vacunas hechas en cultivos celulares de tejidos animales y recombinantes, esto las hace mas accesibles para países en vías de desarrollo; 4) el DNA no requiere de una "estricta" cadena fría para ser transportado y almacenado, lo que en países con orografías altamente accidentadas, como lo es México, hace posible que la distribución de la vacuna se amplíe; y 5) son más seguras, debido a que tanto en el proceso de fabricación como en la aplicación jamás se maneja el agente infeccioso (cuadro 1). Esto reduce los riesgos de accidentes, también ayuda a la economía de la fabricación y además permite el diseño y experimentación de vacunas contra agentes virales peligrosos como la rabia, el coronavirus que produce el síndrome agudo respiratorio (SARS) , el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), los virus que producen fiebres hemorrágicas fatales llamados "virus calientes" como el Hanta, el Nipha, el Hendra , etc. (Tüting *et al.*, 1999; Cichutek; 2000; Dumonteil, 2000; Gurunathan *et al.*, 2000; Garmory *et al.*, 2003).

Cuadro 1. Comparación de las propiedades de algunos tipos de vacunas. Figura modificada de Gurunathan, Klinman y Seder. 2000. *Annu. Rev. Immunol.* 18:927-974

		Vacuna de DNA	Vacuna atenuada	Proteína Recombinante
Respuesta inmune	Humoral B	++	+++	+++
	Celular T^{CD4+}	+++Th1	±Th1	±Th1/Th2
	T^{CD8+}	++	+++	-
Memoria	Humoral	+++	+++	+++
	Celular	++	+++	±
Producción	-Desarrollo y producción	++++	+	++
	-Costo	+++	+	+
	-Almacén y transporte	+++	+	++
Seguridad		+++	++	++++

Una vez inyectado el DNA la respuesta inmune se puede iniciar por distintas vías, dependiendo del tipo de célula que es tranfectada, del sitio de inoculación y de la vía de administración. En general hay tres posibles mecanismos por lo cuales el antígeno es presentado (Bahloul, 1997; Tüting *et al.*, 1999; Gurunathan *et al.*, 2000) (figura 5): transfección directa de células somáticas, transfección directa de células presentadoras de antígeno (APC), transfección de células somáticas y APC, en la que el antígeno puede ser secretado y tomado por otras APC para ser presentado.

A. Transfección directa a células presentadoras de antígeno (APC) derivadas de médula ósea.



B. Transfección directa a células somáticas.

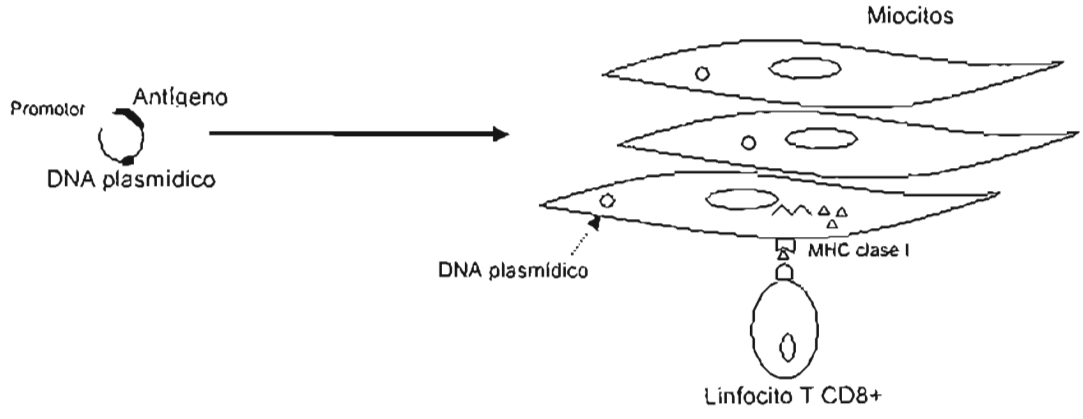


Figura 5. Leyenda en la siguiente página debajo del esquema C.

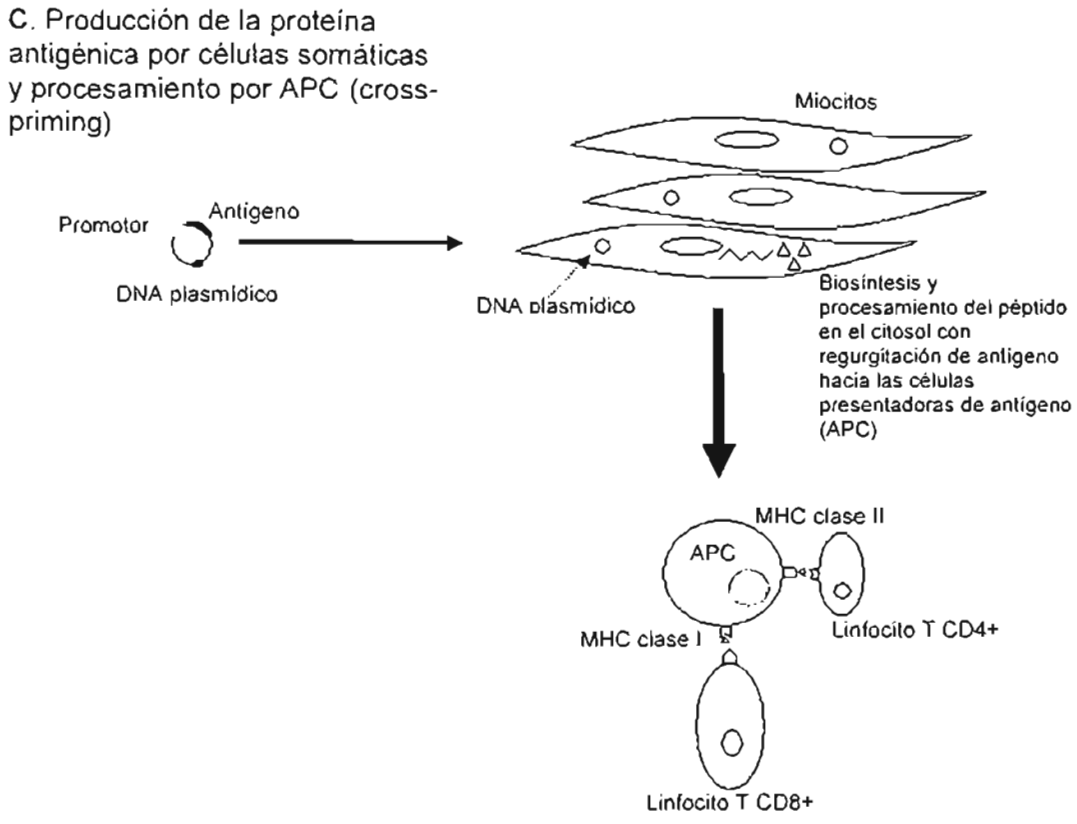


Figura 5. Mecanismos de presentación de antígeno con la inmunización con DNA. A, respuesta inmune mediada por APC derivadas de medula ósea después de la vacunación. La inyección de DNA plasmídico transfecta directamente un número pequeño de células dendríticas (DC) que presentan el antígeno a células T. B, Activación de la respuesta inmune por células somáticas (miocitos, queratinocitos o cualquier otra célula MHC-II negativa). Esto puede ocurrir después de la inyección de DNA plasmídico en músculo o piel, producción de la proteína y presentación hacia las células T por las células somáticas mismas. C, La proteína producida por las células somáticas transfectadas puede ser tomada por una APC e iniciar la activación de las células T (cross-priming). Figura traducida de Gurunathan, Klinman y Seder, 2000.

Optimización de las vacunas génicas

Diferentes estrategias se han propuesto para optimizar las vacunas de DNA, entre las que podemos mencionar: la co-expresión de citosinas, quimiocinas, moléculas co-estimuladoras o de adhesión, el empleo de sistemas de liberación, la administración de adyuvantes, los esquemas de vacunación y el desarrollo de plásmidos que se expresan en células específicas (Tüting *et al.*, 1999; Gurunathan *et al.*, 2000; Weeratna *et al.*, 2000).

Co-expresión de moléculas. Se ha encontrado que el empleo de genes que codifican para distintas moléculas como la interleucina (IL) 2, IL-10, IL-12, ICAM-1, LAF-3 o B7 aumentan la respuesta inmune y pueden ser insertados en el mismo plásmido o en otro distinto al que codifica para el antígeno. Estas moléculas pueden aumentar la producción de células T efectoras, inducir la producción de otras citosinas, como INF-γ u otras interleucinas necesarias en el reclutamiento y activación de células de la respuesta inmune (Tüting *et al.*, 1999; Gurunathan *et al.*, 2000; Weeratna *et al.*, 2000).

Sistemas de liberación. Incluyen lípidos catiónicos o cocleados, microesferas, liposomas, partículas cubiertas de DNA (pistola génica), así como vectores virales y bacterianos. Estos sistemas además de actuar en algunos casos como adyuvantes (vectores virales y bacterianos), ofrecen la gran ventaja de poder administrar las vacunas por otras vías como la oral (Gurunathan *et al.*, 2000; Weeratna *et al.*, 2000) o intranasal (Gentschev *et al.*, 2005; Ben-Yedidia *et al.*, 1999; Pasetti *et al.*, 2003).

Adyuvantes. Se han empleado adyuvantes convencionales como el hidróxido o fosfato de aluminio, las emulsiones o toxinas bacterianas, como la de cólera, para incrementar la activación de la respuesta inmune y también se han aplicado moléculas más específicas como el lípido A monofosforilo, las miotoxinas, algunas citocinas y pequeños fragmentos de secuencias CpG, estas últimas, por encontrarse con más frecuencia en el DNA de bacterias, son reconocidas por los vertebrados como "señales de daño", por esto pueden activar distintas vías de la respuesta inmune innata como adaptativa (Tüting *et al.*, 1999; Gurunathan *et al.*, 2000; Weeratna *et al.*, 2000).

Esquemas de vacunación. Desde las primeras aplicaciones de las vacunas génicas se han ensayado diferentes esquemas de vacunación, los cuales no sólo varían en el tiempo y número de refuerzos, sino también en la aplicación de combinaciones entre vacunas de DNA y vacunas recombinantes o de proteínas

puras (Gurunathan *et al.*, 2000; Weeratna *et al.*, 2000). Como ejemplo Perrin *et al.* (2000) emplearon tres diferentes esquemas de vacunación, informando que la inyección intramuscular de 100µg de DNA aplicados a los días 0 y 28 ó 0 y 175 fue suficiente para inducir altos niveles de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia.

Vías de administración. Hasta el momento casi todas las vias de administración se han aplicado a la vacunación génica: oral, nasal, sub-cutánea, intradérmica, intramuscular, aplicación en tracto genital. La elección de la mejor vía siempre depende de la vía de entrada natural del patógeno, la manera en como se administre (DNA puro, con adyuvantes o con algún acarreador), y hasta de la especie en la que se este estudiando, encontrando resultados distintos para cada enfermedad (Tüting *et al.*, 1999; Gurunathan *et al.*, 2000; Weeratna *et al.*, 2000).

Vectores bacterianos

Los vectores bacterianos son una herramienta que puede ser utilizada ampliamente en el campo de la vacunología, estos poseen las siguientes ventajas: 1) desde el punto de vista de la producción y distribución son menos costosos (las vacunas virales se producen en cultivos de células animales que requieren de tecnología sofisticada e insumos caros) por lo que pueden estar más fácilmente disponibles para países en desarrollo; 2) se han desarrollado cepas bacterianas atenuadas para ser utilizadas como vectores; 3) los vectores bacterianos son sensibles a antibióticos, lo cual los coloca sobre los vectores virales ya que en un proceso a gran escala cualquier reacción adversa puede ser combatida con un tratamiento adecuado; 4) se aplican por vía oral (entre otras), lo que facilita el trabajo en una campaña de vacunación masiva o de fauna silvestre; 5) infectan varias partes del hospedero, como tracto gastro-intestinal, respiratorio, urogenital, los cuales están asociados a tejidos linfoides, 6) las bacterias presentan en su

superficie moléculas que estimulan el sistema inmune (PAMPs) y mejoran la respuesta hacia el antígeno deseado, y 7) tienen la capacidad de transferir el DNA plasmídico directamente a las células presentadoras de antígeno (APC), la cual, quizá es la más importante para la función de la vacuna en sí (Gentschev *et al*, 2000; Shata *et al.*, 2000; Dietrich *et al.*, 2001).

Se han empleado distintas bacterias como vectores, tanto de proteínas como de DNA, entre ellas están *Listeria monocytogenes* y *Shigella flexneri*, las cuales pueden sobrevivir dentro del citosol de las células por escape del fagosoma hacia el citosol celular empleando las hemolisinas o citolisinas que producen. *Escherichia coli*, *Mycobacterium bovis* y *Salmonella enterica* tienen residencia fagosomal y sobreviven por interrupción de la fusión del fagosoma con el lisosoma, estas al parecer, son menos eficientes para transfectar las células, sin embargo se ha informado que por una ruta aún no conocida estas bacterias también son capaces de liberar el DNA plasmídico y de activar el sistema inmune (Dietrich *et al.*, 1998; Gentschev *et al*, 2000; Shata *et al.*, 2000; Spreng *et al.*, 2000; Dietrich *et al.*, 2001; Cochlovius *et al.*, 2002).

Salmonella como acarreador

Se han empleado diferentes cepas atenuadas del género *Salmonella* medicina veterinaria y humana (Kaufmann, 1998). Se han expresado en ellas antígenos de distintos patógenos como Hepatitis B (Tacket *et al.*, 1997), *Yersenia pestis* (Titball *et al.*, 1997), *Listeria monocytogenes* (Verma *et al.*, 1995), *Mycobacterium tuberculosis* (Mollenkopf *et al.*, 2001), *Plasmodium falciparum* (Ruíz-Pérez *et al.*, 2002), *Leishmania major* (Soo *et al.*, 1998) y *Schistosoma mansoni* (Anjam Khan *et al.*, 1994), entre otros.

También se han usado como vehículo para la liberación de vacunas de DNA en las células presentadoras de antígeno (APC), por el tropismo que presenta para infectar estas células. Los patógenos contra los cuales se ha

empleado esta tecnología son: Virus del Herpes simplex tipo 2 (Fló *et al.*, 2001), Hepatitis B (Woo *et al.*, 2001), VIH (Shata *et al.*, 2002; Vecino *et al.*, 2002), *Mycobacterium tuberculosis* (Mollenkopf *et al.*, 2001) y *Echinococcus granulosus* (Chabalgoity *et al.*, 2000), entre otros.

Además por las ventajas que ofrecen los vectores bacterianos constantemente se están desarrollando nuevas estrategias para optimizar su empleo, también se realizan estudios para comprender mejor el mecanismo de su funcionamiento. Los conocimientos que se obtengan podrán evaluarse para la aplicación de vacunas en condiciones de campo (Jain *et al.*, 2000; Garmory *et al.*, 2002; Vega *et al.*, 2003; Babiuk *et al.*, 2004).

También se han aplicado cepas atenuadas de *Salmonella* sp. como acarreadores en distintos animales, como perros para inmunizar contra *Echinococcus granulosus* (Chabalgoity *et al.*, 2000; McVey *et al.*, 2002) y ganado (Van der Walt *et al.*, 2001), esto es de gran importancia en medicina veterinaria, ya que algunas zoonosis se pueden controlar por medio de una vacuna de fácil aplicación.

Empleo de citolisinas

Las bacterias de residencia fagosomal son capaces de liberar el DNA en el citosol de las células infectadas con ayuda de algunas citolisinas o hemolisinas, como la estreptolisina O (SLO), la perfringolisina (PFO), la listeriolisina (LLO) o la pneumolisina (PLY) (Bielecki *et al.*, 1990; Portnoy *et al.*, 1992; Dietrich *et al.*, 2001; Ruiz-Pérez, 2002). Este tipo de proteínas forman poros en las membranas celulares y degradan membranas por una acción semejante a la de los detergentes, la listeriolisina ha sido una de las citolisinas más estudiadas y se encontró que tiene actividad óptima a pH 5.6 y que una vez situada en el citosol su vida media es muy corta, permitiendo así que la membrana celular permanezca

intacta y la célula viva (Cossart *et al.*, 1989; Andrews *et al.*, 1994; Goebel *et al.*, 1997). Además algunas de estas proteínas presentan secuencias PEST (Pro, Glu, Ser, Thr) que permiten su degradación en el citoplasma de la célula hospedera, así no se lisa la membrana citosólica y la célula se mantiene viva con el patógeno en su interior (Decatur *et al.*, 2000).

Pneumolisina

La pneumolisina es uno de los principales factores de virulencia de *Streptococcus pneumoniae* y pertenece a la familia de las proteínas que unen colesterol (colesterol dependientes) (Kelly *et al.*, 2000), en la cual también se encuentran otras citolisinas. Es una proteína de 53 kDa y tiene distintas funciones durante la infección de *S. pneumoniae* (Paton *et al.*, 1993). Se ha demostrado que esta proteína existe en solución como monómero y dímero, y que después forma oligómeros para unirse a la membrana lipídica de la célula blanco, el poro que forma la membrana consta de 30 a 50 subunidades y tiene un diámetro de 350 a 450 Å (Rubins *et al.*, 1998).

El mecanismo de acción y los sitios funcionales de la pneumolisina ya se han descrito: la proteína necesita de un ambiente hidrofílico y la presencia de colesterol en la membrana es indispensable para la formación del poro (Bonev *et al.*, 2001), presenta al menos tres epítopos con los cuales se puede neutralizar la actividad lítica de la proteína, dos de ellos implicados en la función de unión a la célula y el tercero en la oligomerización (de los Toyos *et al.*, 1996), así como también presenta un sitio de activación de complemento (Mitchell *et al.*, 1991). Presenta una región muy conservada dentro de las proteínas que unen colesterol, un "loop" rico en triptófano que es importante para la formación del poro, Gilbert *et al.* (1999) sugieren que el proceso de oligomerización sucede en dos pasos, y que la formación de los dímeros es el paso limitante en la reacción para formar el poro.

ANTECEDENTES

Uno de los primeros trabajos sobre vacunación génica en rabia fue el de Xiang *et al.* (1995), que desarrollaron un plásmido que lleva el gen de la glicoproteína del virus de la rabia bajo control del promotor temprano del citomegalovirus (CMV) y otro con el promotor del SV40, también probaron la eficacia de un plásmido que permite la secreción de la glicoproteína y encontraron que había diferencias importantes en la expresión *in vitro* por la diferencia del promotor, *in vivo* los resultados eran similares, pues ocurría lo mismo con la proteína secretada o unida a la membrana.

A partir de este trabajo se desarrollaron distintas investigaciones: para mejorar y encontrar la dosis ideal que estimule una respuesta inmune protectora (Ray *et al.*, 1997; Perrin *et al.*, 2000; Lodmell *et al.*, 2000; Lodmell *et al.*, 2000; Lodmell *et al.*, 2003); para ampliar la protección hacia los diferentes serogenotipos de los *Lyssavirus* o desarrollar vacunas polivalentes (Bahloul *et al.*, 1998; Desmézières *et al.*, 1999; Jallet *et al.*, 1999); para conocer la respuesta en algunas de las especies blanco, como perros y gatos (Osorio *et al.*, 1999; Perrin *et al.*, 2000; Lodmell *et al.*, 2003) y para conocer su eficacia como tratamiento post exposición (Bahloul *et al.*, 2003).

Los estudios que sirvieron de base para el desarrollo de el presente trabajo fueron los de Bahloul *et al.* (1998) y Jallet *et al.* (1999), en los que se evaluó la eficacia del plásmido pGPV como vacuna génica, tanto *in vitro* (células de neuroblastoma) como en animales de laboratorio (ratones) y demuestra la presentación de antígenos por moléculas del MHC I y II, la producción de anticuerpos antirrábicos y protección al desafío. Posteriormente, en 1999, el Instituto Pasteur de Paris, en colaboración con nuestro grupo, probó el plásmido pGPV en perros y se demostró también en esta especie, la producción de anticuerpos neutralizantes y protección al desafío con virus de la calle (Perrin *et*

al., 2000). De los resultados obtenidos en perros vacunados se encontró que la inyección intramuscular de 100 µg de DNA logra la formación de más de una unidad internacional (UI) y hasta 40 UI de anticuerpos contra la rabia (mínimo requerido por la OMS es de 0.5 UI) (Perrin *et al.*, 2000).

Con base en la metodología del Instituto Pasteur de Paris, nuestro grupo en colaboración con el laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, obtuvo un plásmido vacunal (pPGR) que codifica para la proteína G del virus de la rabia variante HQ.IMSS-1998. Se ha demostrado que este plásmido denorninado pPGR, inoculado por vía parenteral, es capaz de estimular la formación de anticuerpos neutralizantes y de proteger al desafío con virus patógeno en animales de laboratorio (ratones) y recientemente en perros (resultados no publicados).

Por otro lado, en estudios de escalamiento con el plásmido pPGR, se encontró que se obtiene un rendimiento de 1.4 mg/ litro (resultados no publicados), lo que, extrapolado a una escala industrial (si se parte de 100 litros de medio más bacterias transformadas), se obtendrían 143 mg de plásmido vacunal, que equivaldrían a 1430 dosis vacunales (considerando que se inyectan 100 µg por individuo). Con este número de dosis obtenidas se necesitan una gran cantidad de ciclos de fermentación para poder llegar a obtener las suficientes dosis para una campaña de vacunación (14,000,000 de dosis), lo que eleva el costo de la vacuna.

En estudios realizados en la Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología del Hospital de Infectología del Centro Médico Nacional "La Raza", se observó que el uso de una cepa atenuada de *Salmonella enterica* Serovar *typhimurium* SL3261, la cual expresa una variante atenuada de la pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae*, es capaz de liberar tanto proteínas como DNA al citosol celular (0.012% de células transfectadas) (utilizando un plásmido reportero) en ensayos *in vitro*, en una línea celular de macrófagos J774 (Ruiz-Pérez, 2002).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El uso de cepas atenuadas de *Salmonella* sp. como acarreadores en la inmunización con DNA ha sido optimizado con la ayuda de citolisinas. El empleo de este sistema para aplicar por vía oral una vacuna génica contra la rabia puede facilitar su administración y simplificar su producción sin poner en riesgo su efectividad en cuanto a la respuesta inmune.

HIPÓTESIS

La inmunización por vía oral con una mezcla de *Salmonella typhimurium* SL3261 transformadas con el plásmido vacunal pPRG y aquellas transformadas para expresar la pneumolisina, producirá un nivel de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia comparable a la inmunización intramuscular del plásmido vacunal sólo.

OBJETIVOS

General

Evaluar la respuesta inmune de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia utilizando a *Salmonella typhimurium* SL3261 como acarreador del plásmido vacunal pPRG y con ayuda de la pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae*.

Particulares

1. Evaluar *in vitro* el nivel de expresión de la proteína reportera en macrófagos infectados con *S. typhimurium* SL3261 transformada con el plásmido reportero mezclada con *S. typhimurium* SL3261 que expresa la pneumolisina de *S. pneumoniae*, tanto en una forma mutada como nativa.

2. Evaluar en ratones la inducción de inmunidad contra el virus de la rabia ante la administración oral de *S. typhimurium* SL3261 transformada con el plásmido vacunal mezclada con *S. typhimurium* SL3261 que expresa la pneumolisina de *S. pneumoniae*, tanto en una forma mutada como nativa.

Metas

1. Transformar *S. typhimurium* SL3261 con los plásmidos pPRG (vacunal), pCIneo (vector sin gen insertado, control negativo), pPLY-F (pneumolisina mutada), pPLY-W (pneumolisina nativa) y pEFGP (reportero) por separado.

2. Conocer los niveles de actividad de la pneumolisina recombinante mutada en comparación con la nativa.

3. Conocer la eficiencia de la co-infección *in vitro* con *S. typhimurium* SL3261 transformada con el plásmido reportero y *S. typhimurium* SL3261 que expresa la pneumolisina mutada o nativa, utilizando la línea celular de macrófagos murinos J774 por citometría de flujo y microscopia confocal.

4. Vacunar ratones híbridos (C57xCD1) por vía oral, para conocer la eficiencia de la inducción de inmunidad contra el virus de la rabia por la co-infección *in vivo* con *S. typhimurium* SL3261 transformada con el plásmido vacunal y mezclada con *S. typhimurium* SL3261 que expresa la pneumolisina mutada o nativa.
5. Determinar los niveles de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia en los animales vacunados.

6. Determinar los niveles de anticuerpos contra el acarreador, *Salmonella typhimurium* SL3261 en los animales vacunados.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ingeniería genética

Cepas bacterianas empleadas:

Escherichia coli DH5α (SupE44 ∇lac 169φ 80 lac Z∇M 15hsd R17 recA1 endA1 gyrA 96thi-1re1A1; GIBCO ®).
Salmonella typhimurium SL3261 (Aro A::Tn10) (Hoiseth *et al.*, 1981).

Plásmidos empleados:

pCIneo es un vector de clonación para la expresión en células de mamífero con el promotor eucariótico del citomegalovirus (CMV), la señal de poliadenilación del virus SV40, un sitio múltiple de clonación, el gen de resistencia a ampicilina en procariontes y a neomicina en eucariontes (Promega A1410) (figura 6).

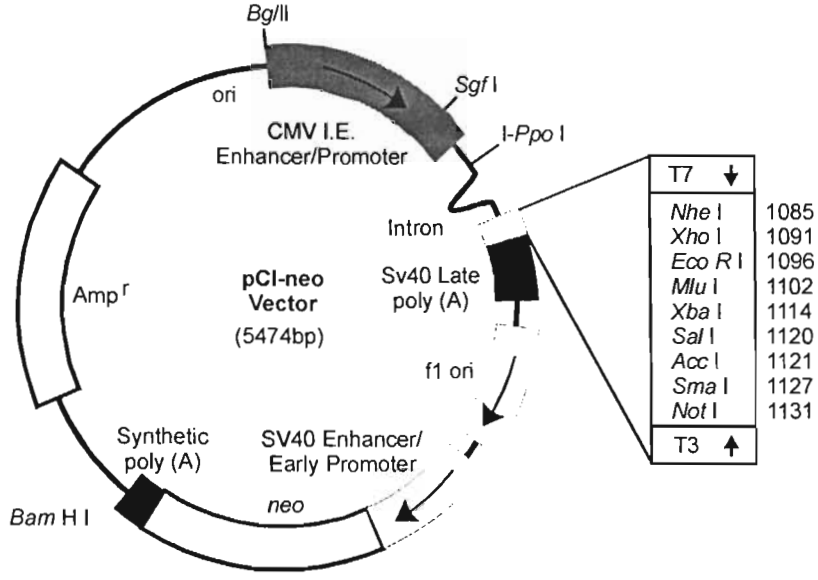


Figura 6. Mapa del plásmido pCIneo, vector de expresión eucariota en el que se insertó el gen de la glicoproteína del virus de la rabia cepa HQ01-IMSS para dar origen al plásmido vacunal pPRG. Este plásmido también se emplea como control negativo ya que no codifica para ninguna proteína en un sistema eucarionte (Promega ®).

pPRG se origina del plásmido pCIneo al que se le clonó el gen de la glicoproteína del virus de la rabia (cepa HQ01-IMSS) en el sitio XbaI de la región de clonación múltiple. Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética Molecular de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México en colaboración con nuestro grupo.

pEFGP contiene el gen que codifica para la proteína verde fluorescente de medusa bajo el promotor de expresión eucarionte del CMV, la señal de poliadenilación del SV40, el gen de resistencia a kanamicina en procariontes y a neomicina en eucariontes (CLONTECH Laboratories, Inc. 6084-1) (figura 7).

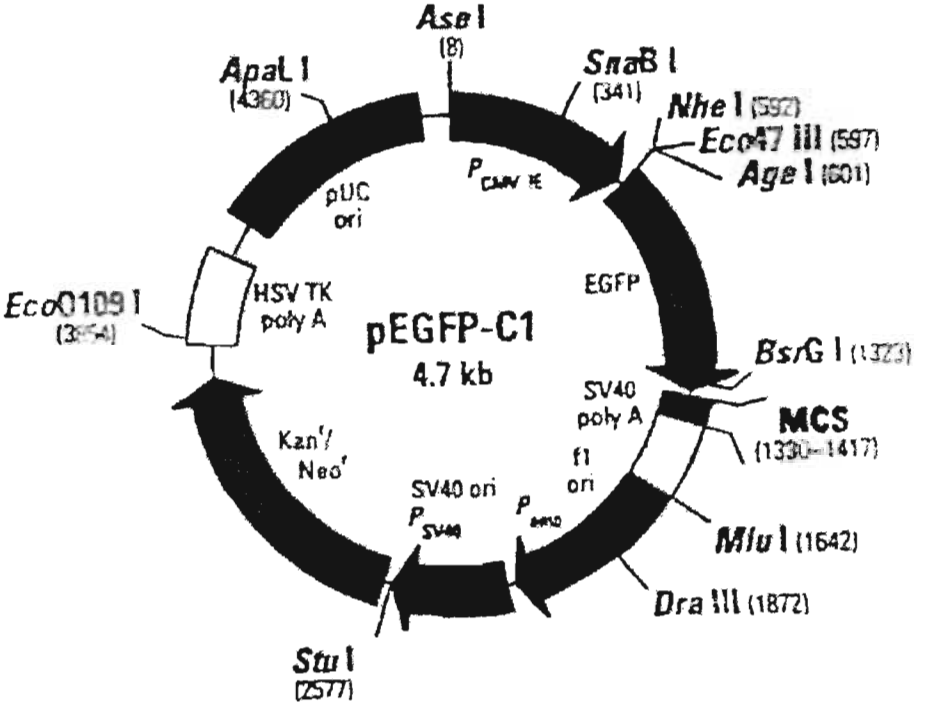


Figura 7. Mapa del plásmido reportero (pEFGP), expresa una proteína verde fluorescente en sistemas eucariontes (Clontech laboratorios ®).

pPLY-F contiene el gen que codifica para la pneumolisina de *Streptococcus pneumoniae*, bajo el promotor procarionte inducible en condiciones micro-aerofílicas *pnirB* (de la nitrato reductasa de *Escherichia coli*), el gen de resistencia a ampicilina y el origen de replicación ColE1. El gen de la pneumolisina presenta

dos mutaciones puntuales: Asp385→Asn que evita la propiedad de activar el complemento (Mitchel *et al.*, 1991) y Trp433→Phe que reduce la actividad hemolítica hasta un 99.9% (Alexander *et al.*, 1994, figura 8).

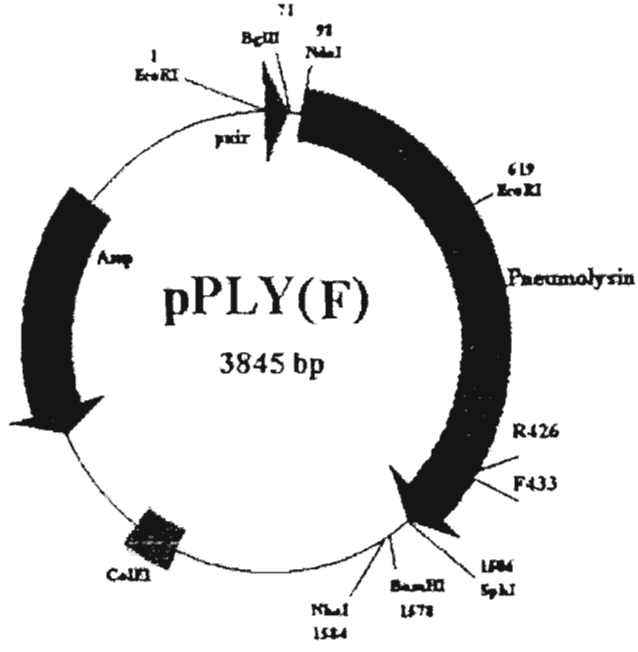


Figura 8. Mapa del plásmido que codifica para la pneumolisina en una forma mutada (pPLY-F) que disminuye la actividad lítica de la proteína, la mutación esta en el aminoácido 433 que en este plásmido codifica para una fenilalanina. Este plásmido es de expresión procarionte (Ruíz-Pérez, 2002).

pPLY-W se origina del plásmido pPLY-F, al gen de la pneumolisina se le regeneró la mutación Trp433→Phe a Phe433→Trp, lo cual le devuelve la actividad lítica a la proteína. Además presenta una mutación puntual Arg426→Leu para generar un sitio Xho1 (Ruiz-Pérez, 2002, figura 9).

Los plásmidos pPLY-F y pPLY-W fueron donados amablemente por el Dr. César R. González Bonilla (Unidad de Investigación Médica en Inmunología e Infectología, Hospital de Infectología "Daniel Méndez Hernández", Centro Medico Nacional "La Raza", Instituto Mexicano del Seguro Social). Todos los métodos de ingeniería genética se realizaron de acuerdo a las recomendaciones de Sambrook y Russell (2001) y de los instructivos de los estuches empleados.

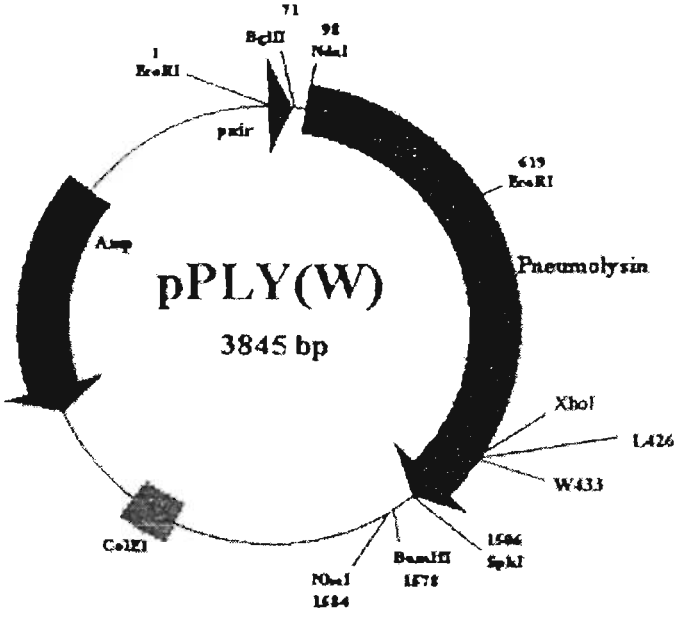


Figura 9. Mapa del plásmido que codifica para pneumolisina nativa (pPLY-W), se regeneró la mutación en el sitio 433 para que codifique para triptófano (W). Este plásmido también es de expresión procarionte (Ruíz-Pérez, 2002).

La purificación de los plásmidos empleados se realizó por medio de lisis alcalina empleando estuches de purificación (Quiagen® 12143), en el caso del plásmido pPRG se purificó con el estuche para dejar el producto libre de endotoxinas (Quiagen® 12391), debido a que también se administró puro por vía intramuscular. Los plásmidos se observaron después de electroforesis en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio en un analizador de imágenes (Syngene ®) con el programa Kodak ID versión 3.6.2.

Células electrocompetentes

Se prepararon bacterias electrocompetentes de la cepa de *Salmonella typhimurium* SL3261 para poder introducir los plásmidos, ya que estos se

encontraban en la cepa de *Escherichia coli* DH5α, que es mejor para manejar en procesos de ingeniería genética.

El procedimiento se realiza en condiciones de esterilidad y en frío. Se partió de un cultivo bacteriano de 250 ml a una DO=1, se centrifugó a 5000 rpm 10´ para formar una pastilla de bacterias que se lavó tres veces con agua desionizada estéril y fría. Al final la pastilla se resuspendió en dos mililitros de una solución fría de agua desionizada-glicerol 20% y se hacen alícuotas de 100 µl en viales de 1.8 ml que previamente etiquetados y fríos. Las alícuotas se almacenaron a -70° C hasta su uso.

Electroporación de las bacterias

Las bacterias electrocompetentes y las celdas para electroporar se colocaron en hielo 30´ antes de iniciar. Se empleo el equipo "Equibio Easyject Plus" con las siguientes condiciones: r= 2500; c= 0025; nr R= 0201; T= 0005. Se mezclaron 0.1µg de plásmido puro con las células electrocompetentes, procurando no hacer burbujas. Esta mezcla se pasó a la celda para electroporar sin hacer burbujas y se dio un pulso eléctrico con las condiciones ya programadas. Después del tratamiento se les adicionó un mililitro de medio SOC (0.5% de extracto de levadura, 2% de triptona, 10mM de NaCl, 2.5mM KCl, 10mM MgCl, 20mM $MgSO_4$, 20mM de glucosa) incubándolas por una hora a 37° C a 200 rpm en un agitador (Shak-r-bath, Lab-line). Posteriormente las bacterias se sembraron en placas de medio infusión cerebro corazón con agar (BHI-agar), adicionadas con el factor de selección (ampicilina para los plásmidos pCIneo, pPRG, pPLY-F y pPLY-W, y kanamicina para el plásmido pEFGP) para poder seleccionar las clonas de bacterias que incorporaron el plásmido y de ahí amplificar la semilla de trabajo.

Curva de crecimiento

La curva de crecimiento de la bacteria transformada con los distintos plásmidos se realizó utilizando un agitador a 100 revoluciones por minuto (rpm) (Shak-r-bath, Lab-line) a 37° C, en medio líquido de infusión cerebro-corazón (BHI-caldo) (Bioxon, 15-3-1-4300112) complementado con 0.01% de ácido dihidroxibenzóico (DHB) (Sigma, D5395), 100 µg/ ml de ampicilina (Sigma, A9518) en el caso de los plásmidos pCIneo, pPRG, pPLY-F y pPLY-W, y 50 µg/ ml de kanamicina (Sigma K-4000) en el caso de las bacterias que portaban el plásmido pEFGP. Se tomaron muestras de 1 ml a los 30, 60, 90 min y cada hora posterior hasta completar las 10 hrs de muestreo. Se midió la densidad óptica de las muestras en el biofotómetro (Eppendorf BioPhotometer) con la función OD600, que detecta la turbidez del medio.

Inducción de proteínas

Las bacterias que contenían los plásmidos pPLY-F y pPLY-W se crecieron en placas de BHI-agar (Bioxon, 15-3-1-4300147) suplementadas con 100 µg/ml de ampicilina y 0.01% de DHB, incubándolas a 37° C toda la noche. Al día siguiente, con una asada de los cultivos anteriores se sembró una semilla de cada una de las cepas en 7 ml de medio BHI-caldo con 100 µg/ml de ampicilina y 0.01% de DHB, que se dejó incubar a 37° C toda la noche. A la siguiente mañana se inocularon 500 µl del cultivo semilla en cada uno de 12 tubos Nalgene (No. Cat. 3118-0050) con 40 ml de medio líquido de tioglicolato (Bioxon, 15-3-1-4300113) suplementado con 100 µg/ml de ampicilina y 0.01% de DHB, y se cerraron herméticamente. Se incubaron a 37° C en agitación constante a 150 rpm. Se emplearon 12 tubos para cada uno de los plásmidos y un tubo de cada plásmido se fue sacando en los siguientes tiempos: 30, 60, 90 min y cada hora posterior hasta completar 10 hrs. Las muestras de cada tiempo se centrifugaron a 6000 rpm 10 min (Sorvall RC-5B), el botón bacteriano se lavó tres veces con solución

tampón de fosfatos (PBS) pH 7.4 estéril y se resuspendió en 5 ml de PBS pH 5.4 estéril. Las bacterias de cada muestra se lisaron por sonicación (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole Palmer Instrument Company) y se centrifugaron a 9000 rpm 10 min. Los sobrenadantes se guardaron a 4° C y posteriormente se analizaron mediante geles de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturalizantes (1% dodecil-sulfóxido (SDS), 140 mM 2-mercaptoetanol) de acuerdo al método descrito por Laemmli (1970), al final los geles se tiñeron con azul de Coomassie.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de las proteínas totales de las muestras se realizó por el método de Bradford siguiendo las indicaciones del estuche Bio-Rad Protein Assay (500-0006). Las lecturas del ensayo se hicieron en el lector de ELISA Dynatech MR5000 con el programa Biolinx versión 2.22 (Dynex).

Ensayos de hemólisis

Se realizaron ensayos de lisis de eritrocitos de carnero para conocer la actividad de la pneumolisina, tanto en su forma nativa (PLY-W) como mutada (PLY-F). Los eritrocitos de carnero se lavaron dos veces con PBS pH 7.4 y se diluyeron al 2% en PBS pH 5.4. A un ml de eritrocitos se agregaron 100 µl de los sobrenadantes de las muestras a diferentes tiempos. Estos se incubaron durante una hora a 37° C y después se centrifugaron (Eppendorf Centrifuge 5415R) a 2000 rpm por 15 min. El sobrenadante de cada muestra (100 µl) se colocó en una placa de 96 pozos (Nunc 475094) y se detectó la liberación de hemoglobina midiendo la densidad óptica de las muestras a 450 nm en el lector de ELISA. Además el ensayo se repitió haciendo diluciones de cada una de las muestras para conocer el título de la actividad.

Cultivos celulares

Cultivo de macrófagos murinos J774

La línea celular de macrófagos murinos J774 (ATCC: TIB-67) se cultivó en medio RPMI 1640 (Gibco 430-1800EA) suplementado con 10% de suero fetal bovino inactivado (SFB) (In vitro S-01), 200mM de glutamina (Sigma G-3126), antibióticos-antimicóticos 100x (In vitro A07), 2-mercaptoetanol 0.1M (Gibco 21985-023), piruvatos 1.1% (Mathenson Coleman and Bell 7264), glicina 500x (Sigma G-7126) y bicarbonato de sodio 7.5% (Sigma S-6014) (medio complementado). Las células se mantuvieron en botellas para cultivo celular de 25 cm^2 (Nunc 136196) y cajas de Petri para cultivo (Corning 430167), en una incubadora (Forma Scientific, Water Jackeled incubator) a 37° C con una atmósfera de 5% de CO_2.

Cultivo de células de neuroblastoma murino CCL-131

Como células susceptibles al virus de la rabia se empleó la línea de neuroblastoma murino (ATCC: CCL 131), la cual se multiplicó en botellas para cultivo celular de 25 cm^2 (Nunc 136196); con Medio Mínimo Esencial (MEM) Glasgow (In vitro ME 055) suplementado con suero fetal bovino (SFB) (Hybrimax, F 4010) al 10% para crecimiento, además de una solución antibiótica-antimicótica 100x (In vitro A07), de glutamina 200mM (Sigma G-3126), piruvatos 1.1% (Mathenson Coleman and Bell 7264), y bicarbonato de sodio 7.5% (Sigma S-6014). Los cultivos se mantuvieron en una estufa incubadora (Lab-line, microprocesor CO_2 incubator) a 37° C, con atmósfera húmeda.

Ensayos de transfección y co-infección de la línea celular J774

Como control y para conocer la expresión del gen reportero (verde fluorescente) se realizaron ensayos de transfección empleando liposomas

siguiendo las indicaciones del estuche (Gibco Cellfectin Reagent 10362-010). En los ensayos de co-infección, empleando a *Salmonella typhimurium* SL3261 como vector del plásmido pEFGP y expresando la pneumolisina, en sus dos formas: mutada (PLY-F) y nativa (PLY-W), se sembraron $1x10^5$ macrófagos en placas para cultivo celular de 6 pozos (Corning 3506) con medio RPMI complementado sin antibióticos, y se incubaron durante dos horas para que las células se adhirieran. Las células se co-infectaron con las bacterias transformadas (MOI 60:1 bacterias:célula), en una proporción de 3:1 de bacterias que contenían los plásmidos pPLY-F, pPLY-W o pCIneo con bacterias que portaban el plásmido pEFGP. La adición de bacterias que contienen el plásmido pCIneo es para mantener la proporción entre las bacterias y poder evaluar la capacidad de *S. typhimurium* de liberar plásmido, por si sola, en el citosol de las células infectadas (figura 10).

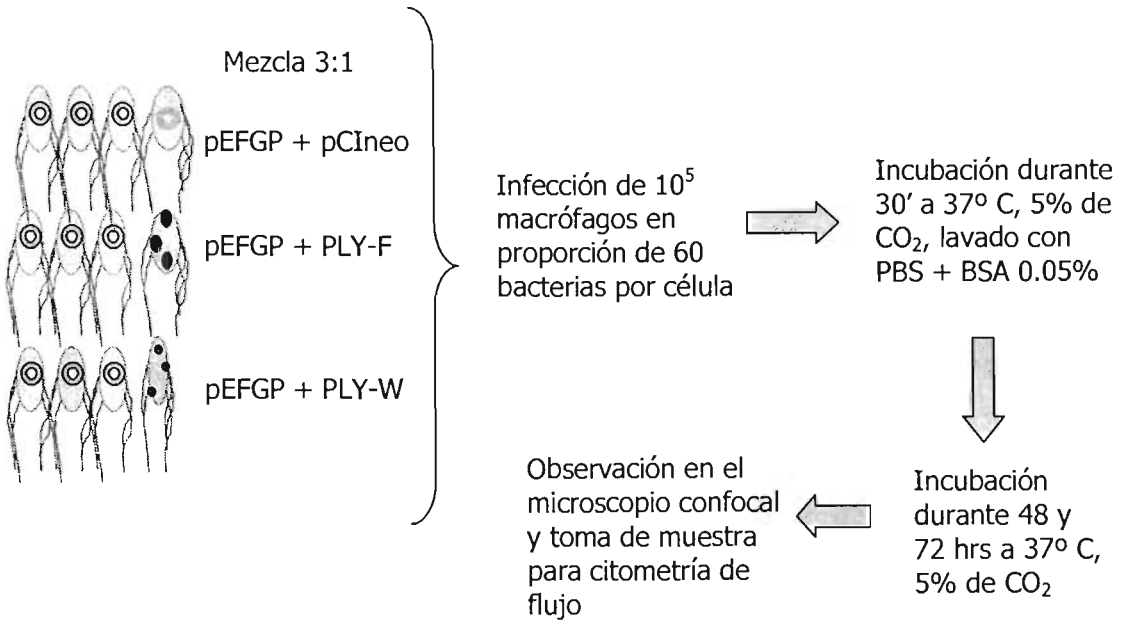


Figura 10. Esquema del procedimiento de los ensayos de co-infección *in vitro*, en la línea celular de macrófagos murinos J774.

Después de la adición de las bacterias a las células, la placa se centrifugó a 1500 rpm durante 8 min (Eppendorf Centrifuge 5804) y se incubaron 30 min a 37°

C con una atmósfera de 5% de CO_2. Al finalizar el tiempo de incubación se retiró el sobrenadante y se hicieron tres lavados con PBS pH 7.4 estéril para retirar las bacterias que no fueron fagocitadas. Al final se agregaron 2 ml de medio RPMI complementado más gentamicina (10 µg/ml) (Ikatin®) y se incubaron 48 y 72 hrs a 37° C con una atmósfera de 5% de CO_2.

Detección de la proteína reportera en los macrófagos J774 transfectados

1. Citometría de flujo. Después de que los macrófagos transfectados cumplían 48 o 72 horas de incubación, según sea el caso, las células se lavaron tres veces con un mililitro de PBS-BSA 0.05% pH 7.4. Posteriormente, se agregaron 500 µl de una solución de PBS-BSA 0.05% + 1% de formalina, se desprendieron por raspado y se incubaron 10 minutos a temperatura ambiente para fijar las células. Se centrifugaron a 2600 rpm 5 min a 27° C (Eppendorf Centrifuge 5415R), el botón celular se lavó con 500 µl de PBS-BSA 0.05% y se volvió a centrifugar. Por último el botón celular se resuspendió en 300 µl de una solución protectora (PBS pH 7.4, 0.1% de azida de sodio, 2% SFB, 5mM EDTA). Las muestras permanecieron a 4° C hasta que se analizaron en el citómetro Epics-altra (Beckman Coulter) con los programas Expo v.2 y WinMDI versión 2.8.

2. Microscopia confocal. Para poder observar las muestras de los macrófagos transfectados por microscopia confocal el ensayo de transfección se realizó de la manera descrita anteriormente, con la única variación de que en la placa de 6 pozos se colocó en el fondo de cada pozo un cubreobjetos para que sobre este se adhirieran las células. Al cumplir el tiempo de incubación las muestras se lavaron tres veces con PBS-BSA 0.05% pH 7.4 y después se fijaron con 3 ml de acetona-alcohol fría (en proporción de 80:20) por 30 min a -20° C. Después las muestras se secaron a temperatura ambiente y se montaron con Vecta-Shield (Vector Laboratories H-1000). Se observaron con el microscopio confocal láser de barrido (Axiovert CM invertido) con un láser de argón 488 nm y

filtro LP505. Las imágenes fueron analizadas con el programa LSM 510 versión 2.5.

Inmunización de ratones híbridos F1 C57xCD1

Se inmunizaron por vía oral cuatro grupos de 10 ratones hembras C57/CD1 con una dosis de 10^9 bacterias/ ratón en 200 µl de PBS pH 7.4 estéril, empleando sondas para ratón (Biomedical needles, Biotek 7910-4EA. Animal feediing needles: CVD 20x1-1/2" W 2-1/4 mm bal). Al grupo uno, que fue el control negativo, se le administraron bacterias transformadas con el vector pCIneo; al grupo dos, le correspondió una mezcla de bacterias que portaban el plásmido pPRG y bacterias con el vector pCIneo, en proporción de 3:1, respectivamente. El grupo tres se inoculó con una mezcla de bacterias que contenían el plásmido pPRG y bacterias que expresaban la pneumolisina mutada (PLY-F) en la misma proporción que el grupo dos; al grupo cuatro se le sustituyó en la mezcla las bacterias que expresan la pneumolisina mutada por aquellas que expresan la pneumolisina nativa (PLY-W). Un último grupo (cinco), se inoculó con 50 µg del plásmido pPRG puro, por vía intramuscular, en el músculo tibial, este último grupo fue de ocho ratones (figura 11).

Los grupos se inmunizaron a los días 0 y 30 después de cada dosis de bacterias se les administró ampicilina en el agua (0.6 mg/ ml) durante 10 días. Las muestras de suero se obtuvieron los días –1, 15, 30, 45, 60 y 90. Las muestras de sangre se obtuvieron del plexo retro-orbital y se colectaron en viales de 500 µl (Sarstedt Microvette 500 Z-Gel 20.1344), después se centrifugaron a 8000 rpm 10 min (Eppendorf Centrifuge 5415R). Una vez obtenido el suero se inactivó por calor (56° C 30 min) en baño maría y se almacenó a –20° C hasta su uso.

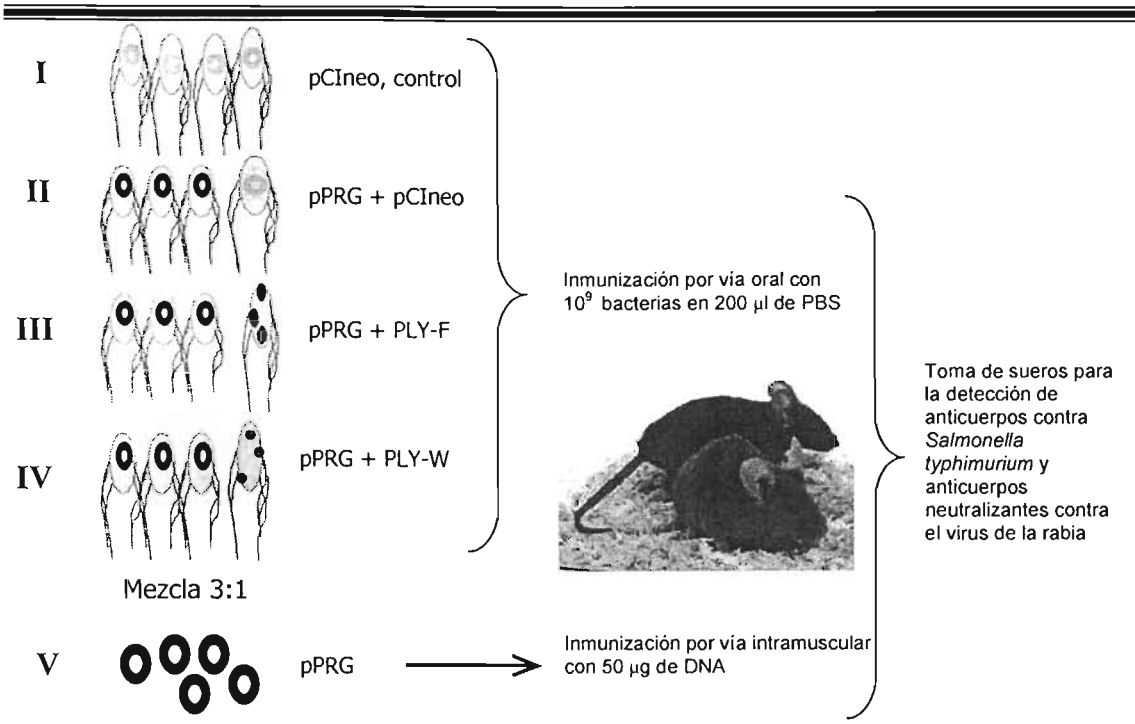


Figura 11. Esquema del ensayo de transfección *in vivo* (vacunación) de los ratones híbridos F1 C57xCD1.

Determinación de anticuerpos contra *Salmonella typhimurium* SL3261

Se realizó un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para detectar los anticuerpos contra el acarreador *Salmonella typhimurium* SL3261. Se sensibilizaron las placas de 96 pozos para las pruebas de ELISA (Nunc 475094) con un cultivo de *Salmonella typhimurium* SL3261 (18 hrs, 37° C en medio BHI-C complementado con 0.01% de DHB), ajustado a 0.5 del nefelómetro de McFarland (1.5×10^8 unidades formadoras de colonias, UFC) con solución salina formalizada 0.6%. Se colocaron 100 µl del cultivo por pozo, se incubó una hora a 37° C y toda la noche a 4° C.

Después de la incubación con los antígenos la placa se lavó tres veces con PBS-Tween 20 al 0.3% (200 µl por pozo) y se bloqueó por 30 min con 100 µl por pozo de PBS-leche descremada 5% (Sveltes®) a temperatura ambiente. Se

realizaron diluciones dobles seriadas de los sueros a titular con PBS-leche 5%, agregándose 100 µl por pozo, el ensayo se realizó por duplicado y se dejó incubar una hora a 37° C. Posteriormente se hicieron tres lavados con PBS-Tween 20 al 0.3% y un bloqueo con PBS-leche 0.5% (30 min, temp. ambiente). Se agregaron 100 µl por pozo del anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado a peroxidasa (Sigma A-9917) diluido 1:2000 en PBS-leche 5%, dejando incubar una hora a 37° C. Antes de revelar se realizaron cuatro lavados con PBS-Tween 20 al 0.3% y después se agregaron 100 µl del sustrato (peroxido de hidrógeno + diaminobenzidina), incubando 30 min a temperatura ambiente en oscuridad total. La reacción se detuvo con 50 µl de ácido sulfúrico 8 N. Las placas se analizaron en un lector de ELISA Dynatech MR5000 con el programa Biolinx versión 2.22 (Dynex) a 490 nm.

Determinación del titulo de anticuerpos antirrábicos neutralizantes

Para la detección de anticuerpos antirrábicos se utilizó la Prueba de Reducción Rápida de Focos Fluorescentes (PRRFF). Esta prueba consiste en enfrentar cantidades constantes de virus rábico en diluciones seriadas de los sueros a probar, después de un periodo de incubación (1 hr a 37° C) la mezcla de virus y suero se inocula en una monocapa de células susceptibles al virus. A las 24 horas de incubación se observa la diferencia del número de focos de infección, entre el suero de referencia y los sueros problema. El suero de referencia debe tener un título conocido en unidades internacionales por mililitro (UI/ml, Bourhy *et al.*, 1996).

Cuando la botella de cultivo de células CCL-131 presentó una capa confluente, se despegaron con 1 ml de tripsina-verseno 0.3% (Difco 0152-13-1), después se les agregó 15 ml de MEM- 10% SFB para resuspender las células. De esta suspensión se colocaron 100 µl en cada pozo de una placa de 96 pozos de fondo plano (Nunc 167008). Esta placa se incubó por 24 hr a 37° C en atmósfera

húmeda con 5% de CO_2, para obtener monoestratos 100% confluentes en cada uno de los pozos.

En otra placa de 96 pozos de fondo plano (placa de neutralización), se hicieron las diluciones de los sueros a titular colocando en cada pozo 100 µl de MEM sin suero como diluyente, excepto en los controles de células a los cuales se les agregaron 150 µl de MEM sin suero. Se realizaron cuatro diluciones triples de los sueros que ya se encontraban en una dilución 1:3 (iniciando en la placa con una dilución 1:9). Con el suero de referencia (inmunoglobulina humana antirrábica con 10 UI/ ml, Berirab*P Aventis-Behring) se hicieron ocho diluciones triples. Se adicionó a cada pozo 50 µl de virus rábico cepa PV (virus Pasteur) que presentaba un título de 20-25 unidades formadoras de focos fluorescentes aproximadamente, excepto en los controles de células. La placa de diluciones se incubó por 1 hr a 37° C en atmósfera húmeda con 5% CO_2. Se sacaron ambas placas de la incubadora y una vez que se observó que el estado de las células fuera normal y que la capa celular fuera confluente, se aspiró suavemente el sobrenadante de las células y se le cambio por las diluciones de la placa de neutralización. Por último se agregaron 50 µl de MEM sin suero a cada pozo y se incubó a 37° C en atmósfera húmeda con 5% CO_2 durante 24 hrs.

Para fijar las células se utilizó una solución de acetona al 80% diluida con alcohol etílico (almacenada a -20° C) (aproximadamente 150 µl en cada pozo), durante 30 min a –20° C, después se desechó la acetona y se dejó secar al aire. En la tinción de los focos de replicación viral se utilizaron 40 µl de conjugado fluorescente antirrábico (Laboratorios Baer, monoclonal anti-nucleocápside) por pozo, se incubó por 30 min a 37° C en atmósfera húmeda, se lavó con agua corriente, y se le adicionaron 80 µl de líquido de montaje (50% glicerol-50% PBS pH 7.2, ajustado a pH 8.3). Se observó en el microscopio invertido de larga distancia focal con lámpara UV (Olympus LH50A) para realizar el conteo de focos fluorescentes. Los datos se analizaron por el método de Reed y Muench (Bourhy *et al.*, 1996) para determinar el título de anticuerpos que presentaba cada suero.

Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los resultados se utilizó el programa SPSS para Windows versión 10.0. Las pruebas aplicadas en todos los casos fueron un análisis de varianza para conocer si había diferencias significativas entre los grupos y la prueba de Tukey para determinar entre cuales grupos existía la diferencia significativa.

RESULTADOS

Transformación de *Salmonella typhimurium* SL3261

Se realizó la electroporación como método de transformación para *Salmonella typhimurium* SL3261, se escogieron las clonas que incorporaron cada uno de los plásmidos, por separado, creciendo las bacterias en cajas de medio BHI-agar adicionado con 0.01% de DHB y el factor de selección según el plásmido incorporado. En la figura 12 se muestran las bandas que corresponden a los distintos plásmidos extraídos de diferentes colonias de *S. typhimurium* SL3261. En la figura 13 se muestra el mapeo por enzimas de restricción que se realizó para verificar la diferencia entre los plásmidos pPLY-F (gel a) y pPLY-W (gel b), este ensayo se hizo con DNA plasmídico extraído de *Escherichia coli* DH5α. La diferencia principal se nota en el carril 3, en el que se realizó el corte con la enzima XhoI. En el gel a que corresponde al plásmido pPLY-F se ven dos bandas por que no hay sitio de corte y en el gel b, correspondiente al plásmido pPLY-W, se ve sólo una banda por que ahí si hay sitio de corte y la enzima linealiza el plásmido.

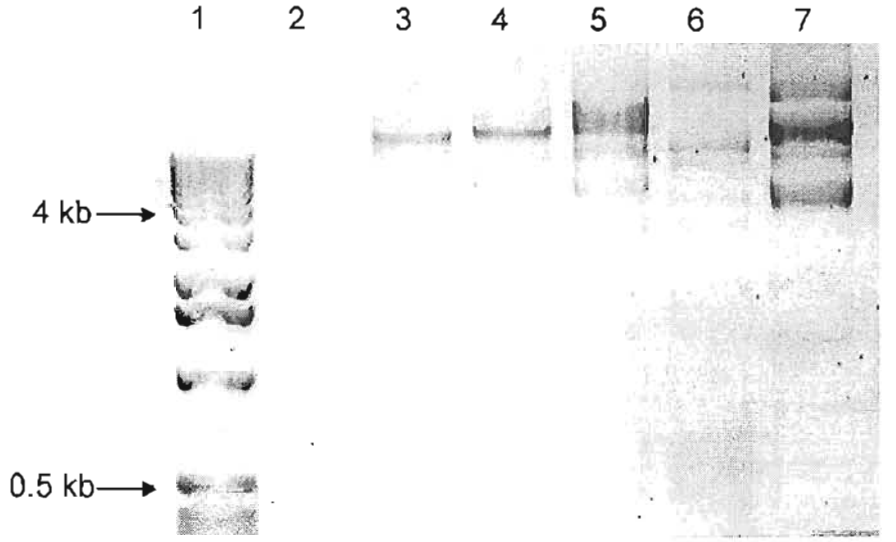


Figura 12. Gel de agarosa al 1% en el que se muestran los distintos plásmidos empleados que fueron extraídos de *Salmonella typhimurium* SL3261. Carriles: 1, Pesos moleculares 1kb; 2, *S. typhimurium* SL3261 sin plásmido; 3, pCIneo; 4, pPRG; 5, pPLY-F; 6, pPLY-W; 7, pEFGP.

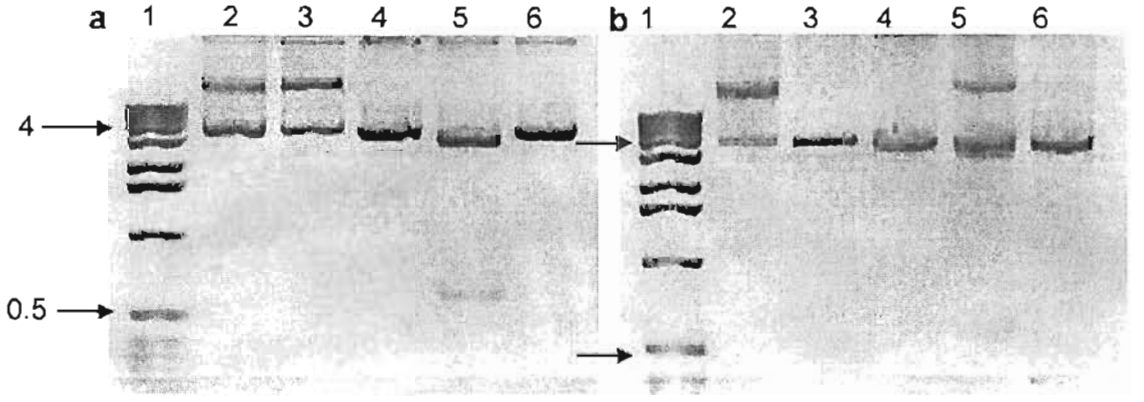


Figura 13. Mapeo por enzimas de restricción de los plásmidos pPLY-F y pPLY-W, para identficarlos. Gel **a** mapeo del plásmido pPLY-F (3.8 kb), gel **b** mapeo del plásmido pPLY-W (3.8 kb). Carriles: 1 marcador de peso molecular 1 kb; 2 DNA plasmídico (DNAp) sin digerir; 3 DNAp + enzima Xho1; 4 DNAp + enzima BamH1; 5 DNAp + enzima EcoR1; 6 DNAp + enzimas Xho1+ Nhe1 (doble digestión). Las flechas nos indican las bandas correspondientes a los pesos de 0.5 kb y 4 kb, respectivamente.

Curvas de crecimiento

Después de la verificación de la incorporación de los plásmidos por la cepa bacteriana SL3261 de *S. typhimurium* se hizo una curva de crecimiento con las bacterias transformadas para conocer si se presentaba algún cambio en el

comportamiento de crecimiento bacteriano. En la figura 14 se muestra la gráfica que lo ilustra y se observa que con la incorporación de los plásmidos se disminuye la densidad óptica máxima alcanzada por la bacteria sin plásmido, es decir hay menor crecimiento bacteriano o menor multiplicación de las bacterias. Los plásmidos pCIneo y pEFGP son los que alteran menos el crecimiento bacteriano, con los plásmidos pPLY-F y pPLY-W se obtuvieron las menores densidades ópticas, con el plásmido pPLY-W no se alcanzó la densidad óptica (DO) de 1, con el plásmido pPRG tarda mas tiempo en empezar la fase de multiplicación aunque después supera la DO alcanzada con los plásmidos pPLY-F y pPLY-W. Estos datos son muy importantes para los tiempos de incubación de los ensayos posteriores.

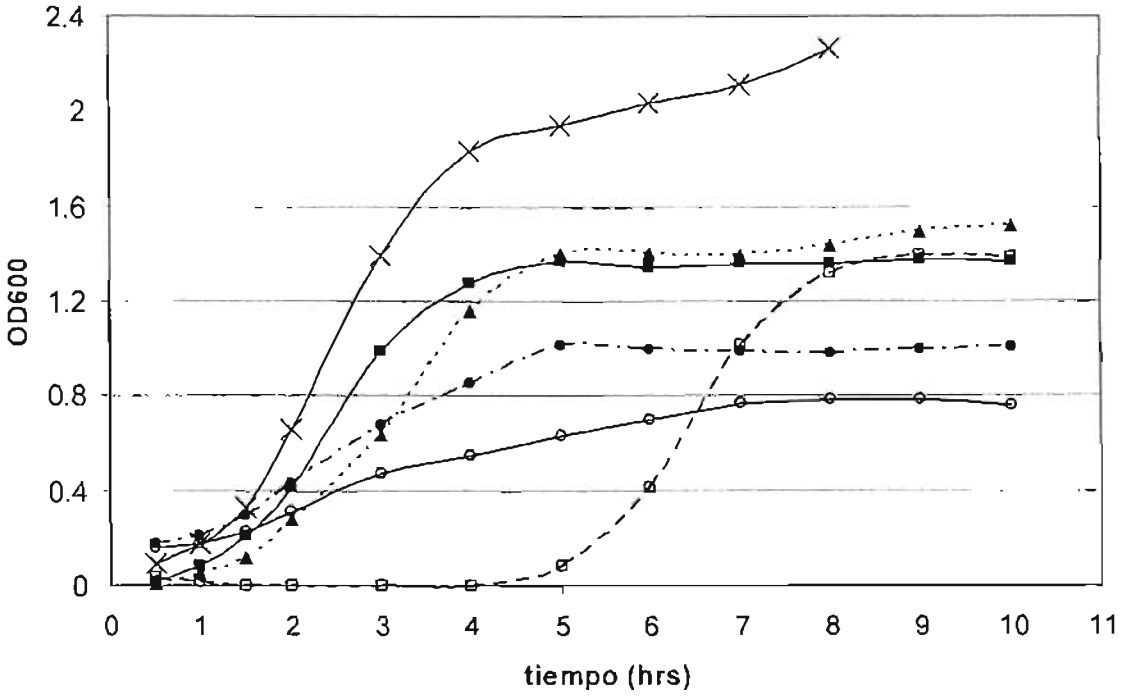


Figura 14. Curva de crecimiento bacteriano de la bacteria *Salmonella typhimurium* SL3261 sin plásmido (x) y transformada con los plásmidos: pCIneo (■), pPRG (□), pEFGP (▲), pPLY-F (●) y pPLY-W (○). La turbidez del medio se detectó por biofotometría.

Expresión y actividad de la pneumolisina recombinante

Antes de iniciar los ensayos de infección tanto *in vitro* como *in vivo* se aseguró la producción y actividad de la pneumolisina recombinante en las bacterias, ya que esta proteína es la que va a ayudar en la liberación del plásmido vacunal en el interior de las células infectadas.

Se realizó la inducción de la expresión de la pneumolisina, tanto en su forma nativa como mutada, en condiciones microaerofílicas; se extrajeron las proteínas totales y se hizo un gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras para buscar la banda correspondiente a la pneumolisina que pesa aproximadamente 53 kDa, en la figura 15 se observa el gel con la banda que corresponde a la proteína señalada por una flecha, por lo que se logró la expresión de la proteína en sus dos formas, tanto mutada como nativa, respectivamente.

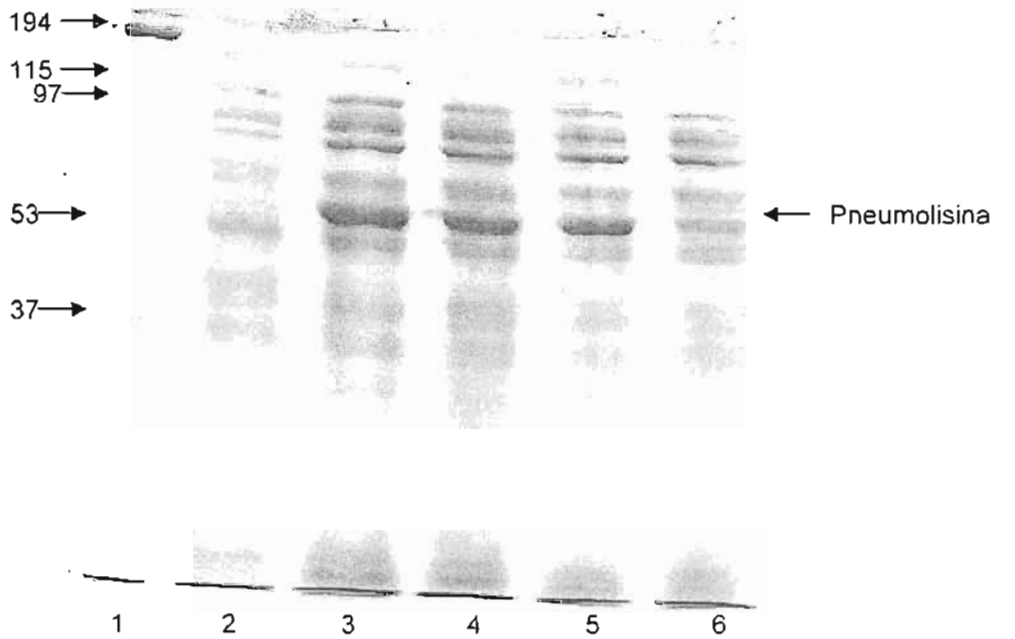


Figura 15. Gel de poliacrilamida al 12% en condiciones reductoras en donde se ven las proteínas totales extraídas de *S. typhimurium* SL3261. Carriles: 1, pesos moleculares kDa; 2, *S. typhimurium* SL3261 sin plásmido; 3, con pPLY-F en medio BHI-caldo; 4, con pPLY-W en medio BHI-caldo; 5, con pPLY-F en medio de tioglicolato; 6, con pPLY-W en medio de tioglicolato. Del lado izquierdo las flechas indican los pesos moleculares correspondientes y del derecho la flecha marca el sitio de la banda de la pneumolisina 53 kDa, aproximadamente.

Además se realizó una curva de producción de las proteínas para conocer tanto la concentración como la actividad lítica a través del tiempo. En la figura 16 se ve la concentración en microgramos por mililitro de proteínas totales extraídas de las muestras a distintos tiempos, tanto de las bacterias con el plásmido para producir la pneumolisina mutada (PLY-F) y la nativa (PLY-W). Se nota que hay un incremento rápido en la producción de proteínas a partir de las dos horas de incubación y después se mantiene casi el mismo nivel hasta las 10 horas. La disminución observada a las seis horas es probable que se deba a un error técnico, ya sea en la sonicación de las muestras o en la detección de proteínas.

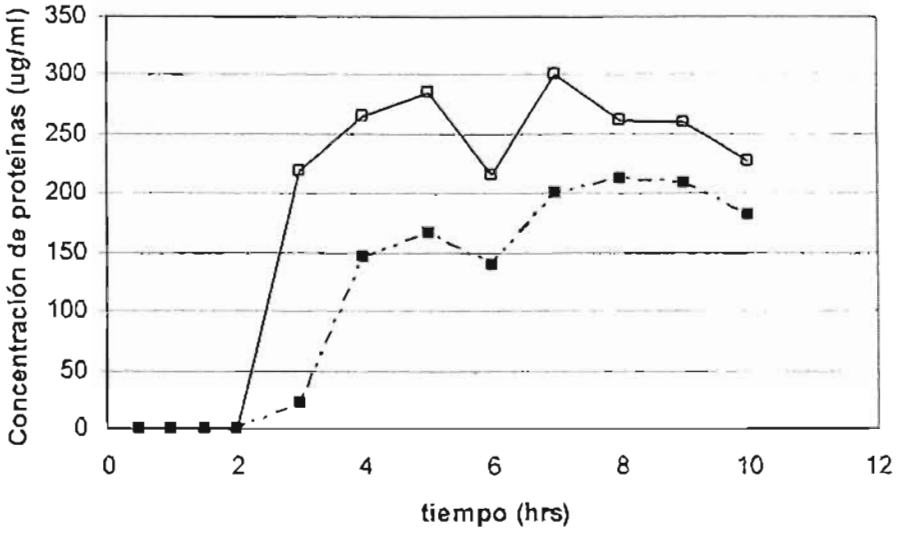


Figura 16. Cuantificación de proteínas totales extraídas de muestras de *S. typhimurium* SL3261 transformada para expresar la pneumolisina mutada (□) y nativa (■) e incubadas a distintos tiempos (desde 0.3 hasta 10 horas).

En lo que respecta a la lisis producida por la pneumolisina en el tiempo (tanto nativa como mutada) en la figura 17 se puede observar que a la media hora de inducción hay una clara diferencia entre la actividad de la pneumolisina mutada con la nativa, presentando la primera una menor actividad lítica (cercana la 30%). Esta actividad se recupera a la hora de incubación, y desde este momento y hasta las diez horas la actividad lítica de ambas proteínas es similar (figura 17). Por esta razón se realizaron diluciones de cada una da las muestras tomadas a distintos tiempos de ambas proteínas (PLY-F y PLY-W), para poder distinguir la actividad y ver el efecto de la mutación en la pneumolisina (PLY-F).

Las figuras 18 y 19 muestran la diferencia en la activad lítica de ambas pneumolisinas, PLY-F y PLY-W, respectivamente. En la figura 18 se observa que la actividad lítica de la pneumolisina mutada (PLY-F) se abate desde las primeras diluciones (1:9 o 1:27) sin importar el tiempo de incubación, sólo en la muestra de las tres horas se observa un máximo de actividad ya que el abatimiento de la actividad lítica se hace en diluciones más altas. En cambio, el comportamiento de la pneumolisina nativa (PLY-W) es diferente, en la figura 19 se observa que a pesar de las altas diluciones (1:243) la actividad lítica sigue sin presentar una disminución, sólo en la muestra que corresponde a la media hora de incubación (línea continua rombos negros) se nota la disminución de la actividad, pero esto se puede explicar por que hay poca cantidad de proteína en la muestra debido al poco tiempo de incubación o crecimiento de la bacteria.

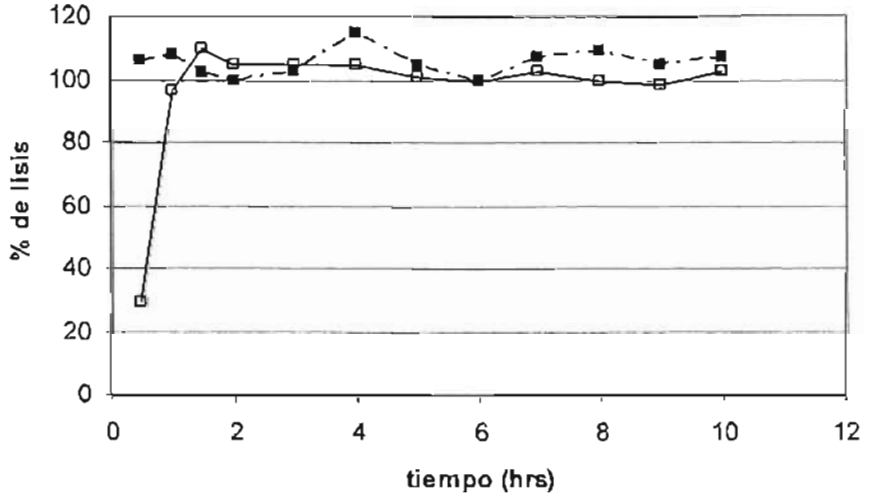


Figura 17. Porcentaje de lisis producida por la pneumolisina mutada (□) y la nativa (■) en muestras incubadas por distintos tiempos, desde 30 min hasta 10 horas.

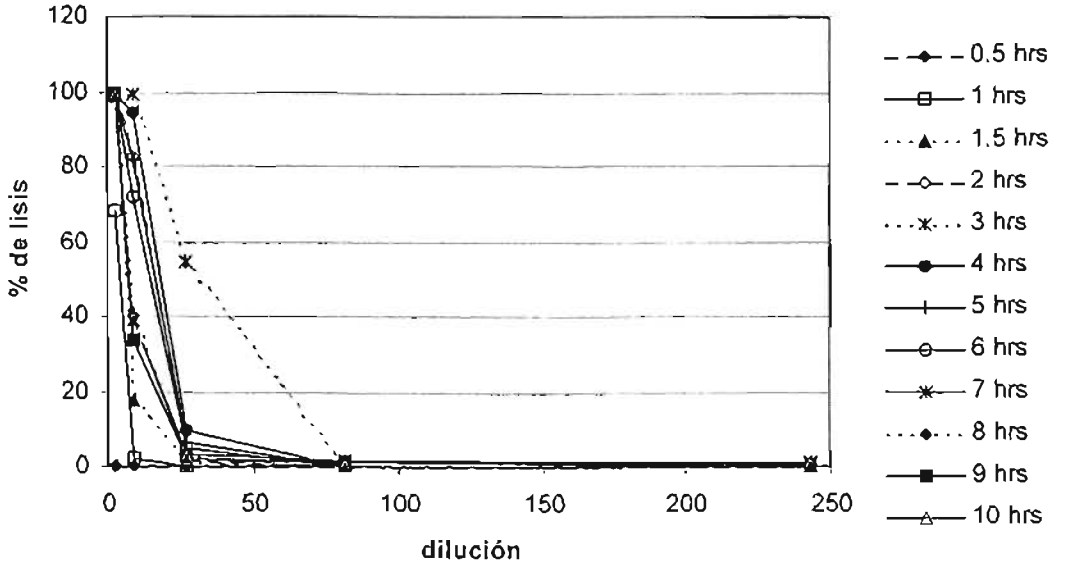


Figura 18. Porcentaje de lisis presentado en cada una de las diluciones de las muestras tomadas a distintos tiempos de las bacterias que producen la pneumolisina mutada. Se realizaron diluciones triples de cada muestra hasta llegar a 1:243.

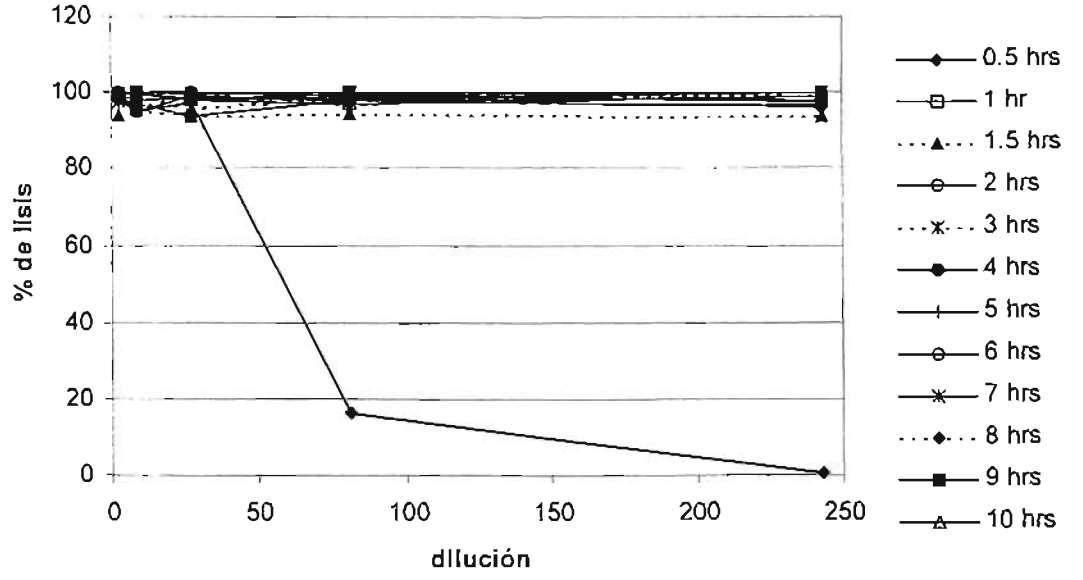


Figura 19. Porcentaje de lisis presentado en cada una de las diluciones de las muestras tomadas a distintos tiempos de las bacterias que producen la pneumolisina nativa. Se realizaron diluciones triples de cada muestra hasta llegar a 1:243.

Transfecciones y co-infecciones *in vitro*, empleando la línea celular de macrófagos murinos J774

Transfecciones con liposomas

Como control y para conocer la expresión de la proteína reportera (EFGP) en el sistema *in vitro*, se utilizó el sistema de transfección por liposomas y sí se detectó la proteína en las células transfectadas (figuras 20 y 21). Los ensayos se realizaron con 48 y 72 horas de incubación post-transfección para conocer a partir de que momento o en que momento era mayor la expresión de la proteína. A partir de las 48 hrs de incubación post-transfección se detecta la proteína reportera, por citometría de flujo se encontró que un 17% de las células estaban transfectadas y en la figura 20 se muestra el resultado por microscopia confocal. A las 72 de incubación el número de células transfectadas se mantuvo, informándose un 16% de células fluorescentes, las microfotografías correspondientes observadas a este tiempo de incubación se muestran en la figura 21. En la figura 22 se observa el desplazamiento de la curva hacia la derecha indicando que hay más células que tienen una mayor intensidad de fluorescencia a las 72 hrs post-transfección.

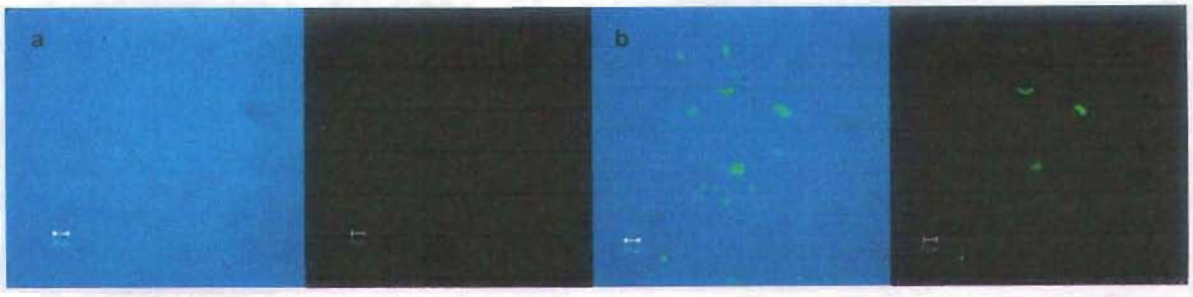


Figura 20. Microfotografías realizadas con microscopio confocal láser de barrido de las transfecciones de la línea celular de macrófagos murinos J774 con el plásmido reportero empleando liposomas como método de transfección. Imágenes obtenidas a las 48 hrs de incubación: **a**, control de células; **b**, proteína reportera.

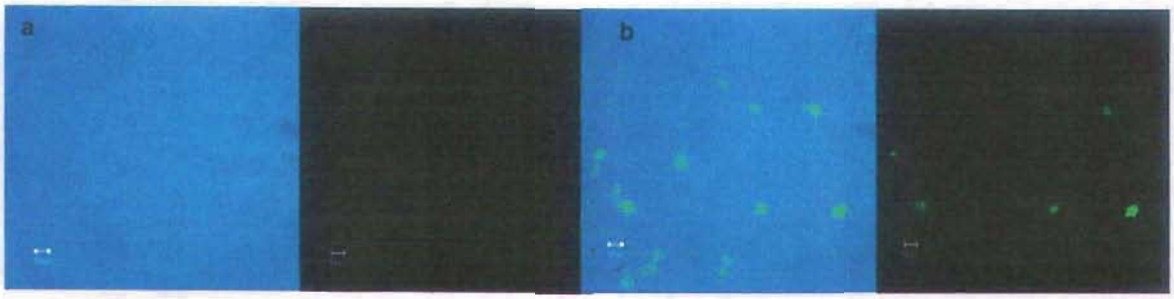


Figura 21. Microfotografías realizadas con microscopio confocal láser de barrido de las transfecciónes de la línea celular de macrofagos murinos J774 con el plásmido reportero empleando liposomas como método de transfección. Imágenes obtenidas a las 72 hrs de incubación: **a**, control de células; **b**, proteína reportera.

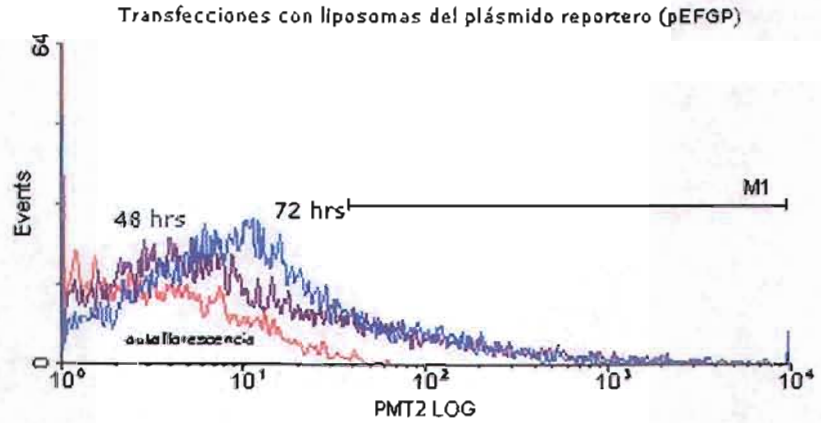


Figura 22. Histograma resultado de los ensayos de citometría de flujo de los macrófagos J774 transfectados con liposomas para que expresen la proteína reportera. La región M1 indica a partir de donde se consideraron a las células positivas. La curva color rojo es la auto-fluorescencia de las células sin transfectar, la curva en morado muestra la fluorescencia a las 48 hrs de incubación y la curva color azul a las 72 hrs. PMT2LOG: parámetro al que se lee la fluorescencia en color verde (FITC); Events: número de eventos que presentan esa intensidad de fluorescencia.

Ensayos de co-infección, Salmonella typhimurium SL3261 como vector de transfección

Una vez verificada la correcta expresión de la proteína reportera en el sistema de expresión (línea celular J774) se realizaron los ensayos de transfección empleando la bacteria *Salmonella typhimurium* SL3261 como vector y

pneumolisina como proteína de ayuda a la liberación de plásmido dentro del citosol de las células infectadas.

A las 48 horas de incubación post-infección se encontró que ya había expresión de la proteína reportera (EFGP) sin necesidad de la pneumolisina (1.6% de células transfectadas), sin embargo también lo hay cuando la pneumolisina se expresa en el sistema (cuadro 2). Cuando se emplea la pneumolisina en su forma nativa (PLY-W) se encuentra fluorescencia en un 0.9% de las células y 1.2% con la forma mutada (PLY-F, figura 23). También se puede observar que hay una ligera modificación en la morfología de las células cuando se emplea la pneumolisina y esta se aumenta cuando se usa en su forma nativa (PLY-W), este cambio consiste en vacuolización y expresión de la proteína reportera (EFGP) en el interior del citoplasma, en contraste con la ausencia de pneumolisina en la que la expresión de la proteína reportera es en la membrana celular. Cuando las observaciones de realizan a las 72 horas de incubación post-infección se encontró que el 1.2% de las células son fluorescentes, con la pneumolisina mutada hay 1.2% y con la nativa 1.4% (cuadro 2, figura 24). Por otro lado, el cambio en la morfología celular cuando se emplea la pneumolisina nativa aumenta mucho (cuadro 2, figura 24).

Cuadro 2. Porcentaje de células que expresan la proteína reportera cuando son transfectadas empleando *S. tyhphimurium* como vector. Los resultados se presentan a las 48 y 72 horas post-infección. pEFGP, plásmido reportero; PLY-F, pneumolisina mutada; PLY-W, pneumolisina nativa.

% porcentaje de células fluorescentes (promedio de n = 3)				
	auto-fluorescencia	pEFGP	pEFGP + PLY-F	pEFGP + PLY-W
48 hrs	0.7	1.6	1.2	0.9
72 hrs	0.9	1.2	1.2	1.4

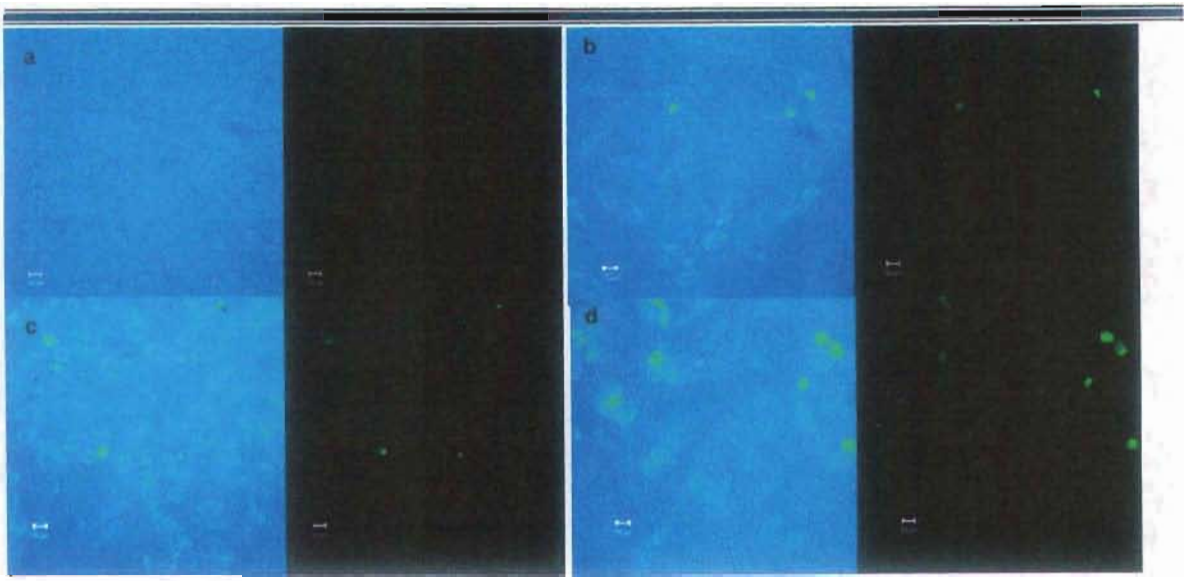


Figura 23. Imágenes obtenidas con el microscopio confocal láser de barrido a las 48 hrs de incubación de la línea celular J774 (panel **a**), empleando *Salmonella typhimurium* SL3261 como vector del plásmido reportero (panel **b**) y en combinación con bacterias que expresan la pneumolisina mutada (panel **c**) y nativa (panel **d**).

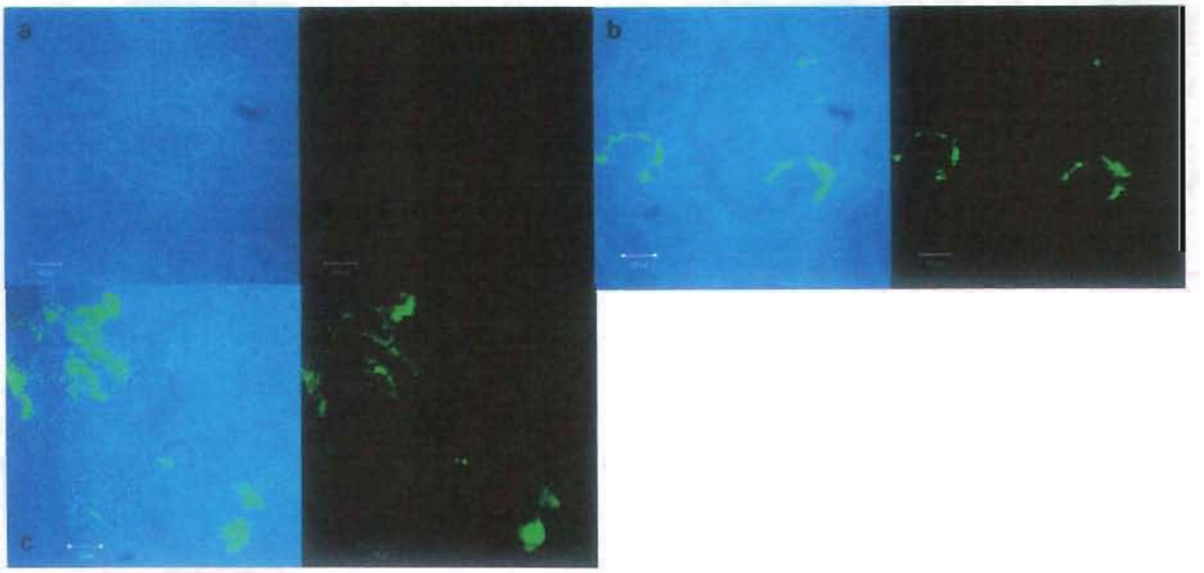


Figura 24. Imágenes obtenidas con el microscopio confocal láser de barrido a las 72 hrs de incubación de la línea celular J774 (panel **a**), empleando *Salmonella typhimurium* SL3261 como vector del plásmido reportero (panel **b**) y en combinación con bacterias que expresan la pneumolisina nativa (panel **c**).

Vacunación oral de los ratones F1 C57xCD1 con las mezclas de bacterias de *Salmonella typhimurium* SL3261 transformadas con distintos plásmidos

1. Anticuerpos contra Salmonella typhimurium SL3261

Se determinó el título de anticuerpos contra el vector, *S. typhimurium* SL3261, por ELISA utilizando la bacteria completa como antígeno. Los resultados del cuadro 3 muestran el promedio de cada grupo. En la figura 25 se puede observar la cinética de formación de anticuerpos durante el tiempo que duró el experimento. En general el título mayor de anticuerpos en todos los grupos se encontró entre los 45 y 75 días, en el día 90 disminuye. Los valores sombreados en el cuadro 3 son aquellos que presentan una diferencia estadísticamente significativa empleando las pruebas de ANOVA y Tuckey ($p<0.05$).

Cuadro 3. Título de anticuerpos contra *Salmonella typhimurium* SL3261 en los grupos inmunizados por vía oral e intramuscular.

	Días post-inmunización					
Grupo	**15**	**30**	**45**	**60**	**75**	**90**
pCIneo	70	128.571	657.143	775	1340	510
pPRG	42	154.286	436	564	480	300
pPRG+PLY-F	6.667	162.5	760	788.889	793.333	386.667
pPRG+PLY-W	22	160	860	818	760	164
pPRG/IM	12.5	12.5	187.5	162.5	100	100

Los valores sombreados son los que presentan una diferencia significativa aplicando la prueba de ANOVA y Tuckey ($p<0.05$).

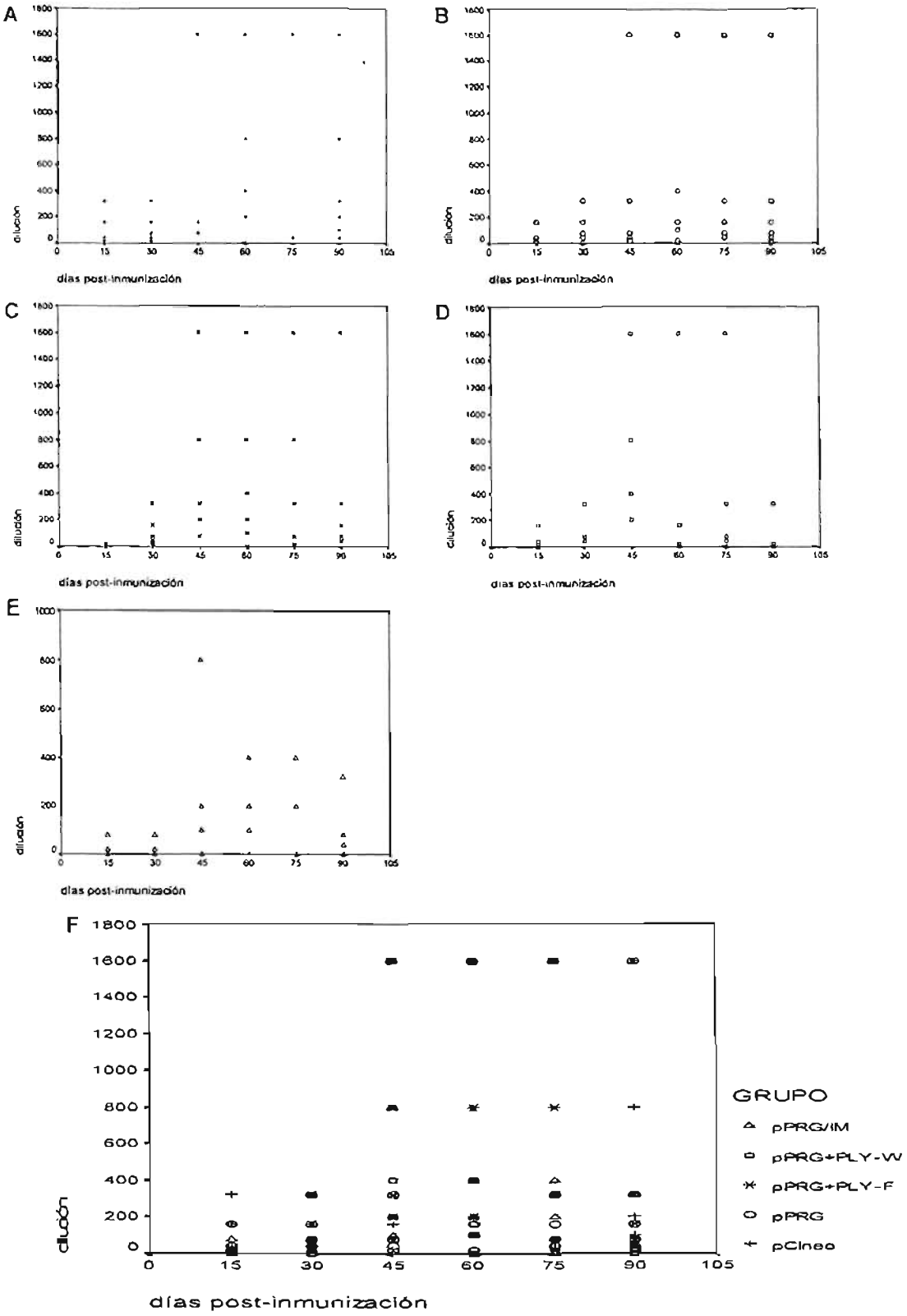


Figura 25. Nivel de anticuerpos contra Salmonella typhimurium SL3261 en cada uno de los grupos estudiados. **A** pCIneo (+), **B** pPRG (○), **C** pPRG + PLY-F (⁎), **D** pPRG + PLY-W (□), **E** pPRG/IM (Δ) y **F** gráfica que representa los cinco grupos en conjunto.

2. Anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia

Con la inmunización de los ratones híbridos C57xCD1 se detectó un nivel protector de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia (>0.5 UI/ml) desde el día 15 post-inmunización (pi) en el grupo pPRG/IM (1.89 UI/ml), que son los animales vacunados por vía intramuscular, control positivo (cuadro 4). En los otros cuatro grupos se lograron detectar anticuerpos neutralizantes pero aún no llegaban al nivel mínimo que considera la Organización Mundial de la Salud como protector, esto es >0.5 UI/ml. Al día 30 pi los grupos pPRG y pPRG+PLY-F, que corresponden a inmunización oral con el plásmido vacunal y el vacunal más pneumolisina mutada ya habían superado las 0.5 UI/ml, en promedio, con 1 y 0.6 UI/ml, respectivamente. El grupo pPRG/IM aumentó sus niveles de anticuerpos antirrábicos a 76.8 UI/ml (cuadro 4 y figura 26).

Cuadro 4. Titulo de anticuerpos virus-neutralizantes (UI/ml) contra el virus de la rabia en los ratones vacunados por vía oral.

	Días post-inmunización					
Grupo	**15**	**30**	**45**	**60**	**75**	**90**
pCIneo	0.23	0.49	0.42	0.42	1.94	0.59
pPRG	0.36	1.04	0.36	2.53	1.06	0.67
pPRG+PLY-F	0.1	0.62	0.51	1.32	0.58	5.06
pPRG+PLY-W	0.03	0.27	1.21	1.32	0.7	10.88
pPRG/IM	1.89	76.78	76.32	52.13	26.1	93.88

Los valores sombreados son los que sobrepasan el valor de 0.5 UI/ ml nivel mínimo establecido por la Organización Mundial de la Salud como protector.

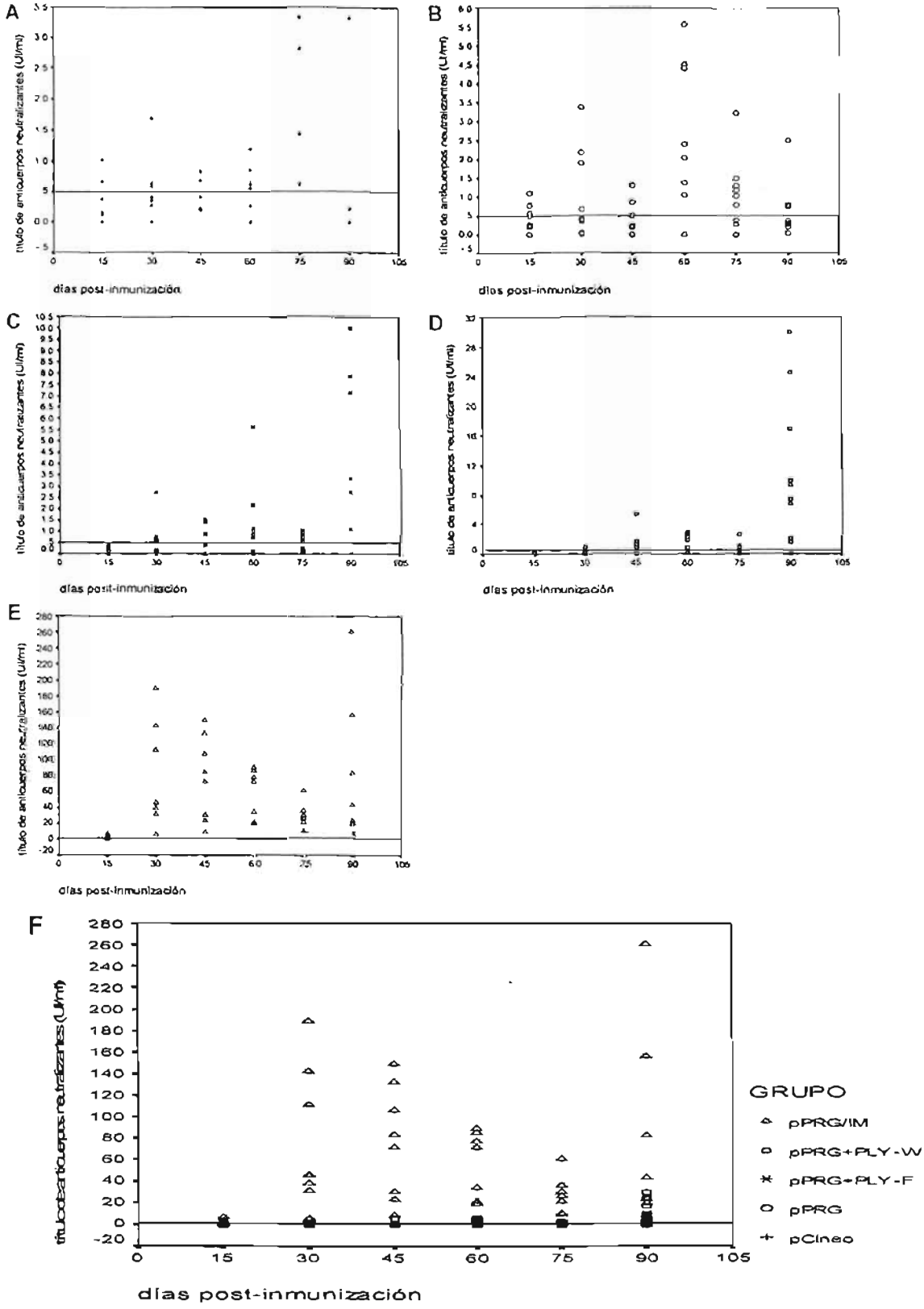


Figura 26. Título de anticuerpos neutralizantes contra el virus de la rabia en los grupos estudiados. **A** pCIneo (+), **B** pPRG (○), **C** pPRG + PLY-F (⁎), **D** pPRG + PLY-W (□), E pPRG/IM (Δ) y **F** gráfica que representa los cinco grupos en conjunto.

En la muestra correspondiente al día 45 pi el grupo pPRG/IM mantuvo sus niveles (76.3 UI/ml), el grupo pPRG disminuyó a 0.4 UI/ml, el grupo pPRG+PLY-F disminuyó también su nivel pero se mantuvo por arriba del valor mínimo (0.5 UI/ ml), el grupo pPRG+PLY-W aumentó sus niveles hasta 1.2 UI/ml, mientras que el grupo pCIneo, control negativo, se mantuvo por debajo de las 0.5 UI/ ml (0.4 UI/ml) (cuadro 4 y figura 26).

En el día 60 pi los cuatro grupos inmunizados presentaron niveles superiores a 0.5 UI/ml: 2.5, 1.3, 1.3 y 52.1 UI/ml que corresponden a los grupos pPRG, pPRG+PLY-F, pPRG+PLY-W y pPRG/IM, respectivamente. El grupo control negativo, pCIneo presentó 0.4 UI/ml. El día 75 pi los niveles de anticuerpos en los grupos seguían siendo protectores, y en el grupo control negativo presentó un aumento a 1.9 UI/ml (cuadro 4 y figura 26A), estos datos concuerdan con lo encontrado por Tordo (comunicación personal) que observa neutralización del virus de la rabia cuando inmuniza ratones por vía intramuscular con el plásmido comercial solo (pCIneo).

En el día 90 pi los grupos pCIneo y pPRG disminuyeron sus niveles de 1.9 a 0.6 y de 1.1 a 0.7 UI/ml, respectivamente; mientras los grupos pPRG+PLY-F, pPRG+PLY-W y pPRG/IM aumentaron de 0.6 a 5.1, 0.7 a 10.9 y 26.1 a 93.9 UI/ml, respectivamente (cuadro 4 y figura 26).

El análisis estadístico de las muestras por la prueba de ANOVA mostró que hubo diferencias significativas ($p < 0.01$) entre los grupos. Al aplicar la prueba de Tuckey para conocer entre que grupos se encontraban las diferencias significativas ($p < 0.01$) resultó que sólo la diferencia de promedio entre el grupo pPRG/IM, plásmido vacunal por vía intramuscular, y los demás grupos fue significativa, además de que no se encontraron diferencias significativas con el control en ninguno de los casos.

DISCUSIÓN

En general los plásmidos que codifican para la pneumolisina (pPLY-F y pPLY-W) parecen ser tóxicos para las bacterias debido a que no permiten su correcta multiplicación ya que presentaron las más bajas densidades de crecimiento durante el ensayo. El plásmido vacunal es muy grande (7000 pb), por esto se tarda más en iniciar la fase de división exponencial de las bacterias, provocando que el punto máximo de crecimiento se logre hasta las nueve horas, en comparación con la bacteria sin plásmido que lo alcanza a las 5 horas, aunque después siga aumentando la densidad óptica pero en menor grado. Con los plásmidos reportero y vector el comportamiento de la curva de crecimiento es muy semejante al presentado por la bacteria sin plásmido. Las modificaciones en las curvas de crecimiento de las bacterias transformadas con los distintos plásmidos son importantes desde un punto de vista biotecnológico, ya que implican modificaciones en los tiempos de incubación o de cosecha de las bacterias.

La pneumolisina tanto en su forma mutada como nativa fueron producidas por *S. typhimurium* SL3261 al crecer la bacteria en medio de tioglicolato, el cual permite mantener condiciones microaerofílicas. Se observó un claro incremento de producción de las proteínas PLY-F y PLY-W a partir de las tres hasta las diez horas de incubación, en extractos obtenidos de lisis bacteriana por sonicación.

En cuanto a actividad de ambas proteínas, la diferencia de la capacidad lítica de los extractos se observa a la media hora y después esta actividad es muy semejante en ambas, esto puede indicar que la proteína mutada tiene actividad residual aunque no en el grado de la nativa. Una clara diferencia entre la pneumolisina mutada y la nativa se observó cuando se hicieron diluciones encontrándose así el efecto de la mutación en la actividad de la proteína. En los ensayos con la pneumolisina mutada, la disminución de la actividad lítica se observó a partir de la dilución 1:3, en cambio con la pneumolisina nativa la

actividad lítica disminuye a partir de diluciones superiores a 1:243, con esto se demuestra que este fenómeno, al parecer, es dependiente de la concentración de proteínas y además que con pequeñas cantidades de la proteína se logra 100% de lisis en el caso de la pneumolisina nativa. Por otro lado se detecta una actividad lítica residual en la proteína mutada. Es posible que otros sitios que no están mutados también intervengan en la actividad lítica de la proteína y por esto no se pueda anular al 100% la actividad de la proteína, esta idea concuerda con lo informado por de los Toyos *et al.* (1996), que menciona que al menos tres epítopos están involucrados en la actividad lítica de la proteína. Por otro lado, la actividad residual observada en la pneumolisina mutada contrasta con lo reportado por Ruiz-Pérez (2002), ya que se informa que las muestras que contenían esta proteína no presentaban actividad hemolítica, por lo que se puede supone que una mutación se pudo presentar durante los pases dados a la bacteria transformada recuperando la actividad lítica aunque no en el mismo grado que la pneumolisina nativa.

En las pruebas realizadas con los liposomas como vehículo de transfección se encontró expresión de la proteína reportera que es codificada por un plásmido de expresión eucariótica, por lo que la proteína fue correctamente sintetizada por este sistema celular. Además, se logró una transfección eficaz ya que la producción y detección de la proteína se logró desde las 48 hasta las 72 horas de incubación post-transfección, con 17% y 16% de células transfectadas, respectivamente. Ruiz-Pérez (2002) encuentra un 80% de células transfectadas a las 48 horas de incubación y aunque este porcentaje es considerablemente mayor, es importante tener en cuenta que el sistema en el que evaluó la transfección es diferente tanto en los lípidos empleados como en las células blanco.

Cuando *S. typhimurium* SL3261 sirve como acarreador del plásmido reportero, tanto a las 48 como a las 72 horas post-infección se encontró expresión de la proteína sin necesidad de la pneumolisina, lo que coincide con lo reportado por Shata y colaboradores (2000), que expone que por un ruta aún no conocida

esta bacteria es capaz de liberar plásmidos al citosol de las células que infecta. Dietrich *et al.* (2001) reportan que 0.07% (6 horas) de células dendríticas son transfectadas cuando *S. typhimurium* se emplea como acarreador de un plásmido reportero, esto sin el uso de citolisinas, en el presente trabajo se encontró entre 1.2 y 1.6% (72 y 48 horas) de células transfectadas, la diferencia se puede explicar por el tiempo al cual se hicieron las observaciones. Sin embargo, las observaciones de este trabajo apoyan la idea de que por alguna vía el plásmido transportado por la bacteria es capaz de llegar al citosol o núcleo de la célula infectada. Por otro lado, se encontró también expresión de la proteína reportera a las 48 y 72 horas cuando se administran como adyuvante salmonelas que expresan la pneumolisina nativa como mutada. Estos resultados son contradictorios con los reportados con Ruíz-Pérez en el 2002, quien encontró que se expresa la proteína reportera únicamente cuando se administra la salmonela que expresa la pneumolisina nativa. Además el porcentaje de células transfectadas por este sistema (0.9 a 1.4%) fue mayor al encontrado por Ruiz-Pérez (2002) (0.006 a 0.012%). Esta diferencia puede deberse a que en el presente trabajo se detectó una actividad residual en la pneumolisina mutada.

No obstante que se encontró expresión de la proteína reportera en todos los casos si se detectaron diferencias cuantitativas. A las 48 horas de incubación hay un incremento en la expresión de la proteína reportera sin pneumolisina en comparación que con la pneumolisina mutada y nativa. A las 72 horas de incubación el mayor porcentaje de células fluorescentes fue encontrado en presencia de la pneumolisina nativa. A pesar de que las diferencias son pequeñas esto quizá indique que la pneumolisina nativa puede favorecer la transfección o expresión de la proteína a tiempos más largos por que los mejores resultados de actividad de la pneumolisina como proteína que ayuda a la liberación de DNA plasmídico se encontró a un mayor tiempo de incubación. Otro punto que se debe resaltar es que la actividad de la pneumolisina no interfiere con la síntesis de la proteína reportera. A pesar de que hay un cambio en la morfología de los macrófagos, pues se encontraron más vacuolas o vesículas en las células, estas

alteraciones quizá se deban a cierta toxicidad de la pneumolisina hacia la línea celular, ya que este efecto se acentúa cuando la pneumolisina se encuentra en su forma activa. Aunque en trabajos anteriores (Ruiz-Pérez, 2002) no se encontró toxicidad de la proteína hacia la línea celular J774. Sin embargo, se puede especular que si la pneumolisina causa un ligero daño en un proceso de infección *in vivo*, se activarán más células del sistema inmune que sean capaces de fagocitar y limpiar la zona de infección, y así se procese más antígeno generándose una mejor respuesta inmune. Esta acción adyuvante se parece a la publicada con el empleo de miotoxinas para inoculación intramuscular de vacunas de DNA.

Detectar los anticuerpos contra el acarreador sugiere la eficacia de la inoculación en los diferentes grupos de animales. En general, sí se detectaron anticuerpos contra la bacteria en los animales inoculados, lo que nos puede indicar que las bacterias eran viables (aunque antígenos inactivados pueden también generar una respuesta inmune) al momento de inocular y que fueron capaces de infectar a los ratones. Al parecer la respuesta hacia estas bacterias fue un poco tardía, ya que hasta el día 45 post-vacunación (seis semanas) se detectaron anticuerpos y después del refuerzo se presentó un aumento en los títulos; sin embargo, Chabalgoity *et al.* (2000) detectan anticuerpos en saliva (IgA) sólo después de nueve semanas post-vacunación, esto hecho en perros inmunizados con *S. typhimurium*. Al aplicar la prueba de ANOVA y Tuckey sólo se detectó una diferencia significativa ($p<0.05$) en dos muestras, entre el grupo control negativo inoculado con el plásmido vacunal por vía intramuscular contra los demás grupos inoculados con salmonela por vía oral. Además las desviaciones estándares entre los diferentes grupos a los que se les administró *S. typhimurium* por vía oral fueron muy amplias, debido quizá a diferencias en la inmunización de los ratones.

En lo que se refiere a los anticuerpos antirrábicos virus neutralizantes, con la inmunización por vía oral empleando *S. typhimurium* SL3261 como vector se

logró sobrepasar el título de anticuerpos neutralizantes considerado por la Organización Mundial de la Salud como protector, que es de 0.5 UI/ml. Aunque la aplicación intramuscular del DNA vacunal puro genera títulos superiores quizá se pueda mejorar el resultado ajustando dosis y refuerzos, considerando que en este trabajo sólo se probó un esquema de una dosis y un refuerzo. También podrían mejorarse los resultados logrando mejorar la infectividad con *Salmonella*. Si comparamos los resultados con los reportados con trabajos anteriores como los de Baloul *et al.* (1998) y Perrin *et al.* (2000) el título de anticuerpos encontrado con la inmunización intramuscular es comparable, así que la mejora para poder administrar la vacuna por vía oral se debe de enfocar al vector bacteriano empleado.

Comparando el resultado del grupo que no tiene pneumolisina contra los que si la tienen, encontramos que la detección de un nivel de anticuerpos protector se observó primero en el grupo sin pneumolisina o con la pneumolisina mutada, a partir del día 30; mientras que cuando se emplea la pneumolisina activa los anticuerpos protectores se encuentran a partir del día 45. Sin embargo, en este último grupo el nivel de anticuerpos sigue aumentando hasta el día 90, mientras que en el grupo tres lo hace en menor nivel y en el grupo dos el nivel de anticuerpos ya esta disminuyendo.

Este efecto quizá se relacione con el fenómeno observado *in vitro* con la línea celular J774, en el que se cree que si la pneumolisina causa un daño en el sitio de infección se puede inducir una mejor respuesta, sólo que aquí se observa que la respuesta se mantiene durante mas tiempo, en lugar de aumentar el título. Esta puede ser una ventaja si se piensa en el tiempo entre refuerzos que se deban aplicar, es decir, si se emplea una proteína como la pneumolisina el tiempo transcurrido entre refuerzo y refuerzo puede ser mas largo.

Como diferencias significativas al realizar el análisis estadístico sólo se encontraron entre el control positivo comparado contra los otros cuatro, este efecto

se puede ser el resultado de la respuesta inmune heterogénea que hubo en los ratones (según resultados de detección de anticuerpos contra *S. typhimurium*). O bien, también puede deberse a que como se emplearon ratones híbridos, y no una cepa singénica la respuesta individual puede ser muy variada, ya que no se controlan los factores genéticos. Este tipo de animales son más semejantes a los animales o individuos blanco de la vacuna, ya que en la naturaleza no se encuentran cepas de animales singénicas y este resultado puede representar mejor como se comportaría la vacuna en animales domésticos o silvestres. Esta idea también se fundamenta por el hecho de que no sólo en los grupos inmunizados por vía oral se encontró esta variedad en el título de anticuerpos antirrábicos, también se encontró en el grupo inmunizado por vía intramuscular con el DNA vacunal puro.

La aplicación por vía oral es muy útil en el desarrollo de una vacuna, ejemplo claro es la distribución de cebos en Europa y Norteamérica, para controlar la rabia silvestre transmitida principalmente por el zorro rojo (*Vulpes vulpes*), si se estandariza mejor la técnica para inducir anticuerpos antirrábicos se podrían preparar cebos que contengan la bacteria con el plásmido vacunal dentro y así distribuirlos para vacunación de fauna silvestre.

CONCLUSIONES

1. Se logró la transformación de *S. typhimurium* SL3261 con los distintos plásmidos estudiados (pCIneo, pPRG, pEFGP, pPLY-F y pPLY-W) y estos influyen de manera diferencial en el crecimiento de la bacteria.

2. *S. typhimurium* SL3261 es capaz de transportar y liberar en el sistema eucarionte el plásmido vacunal contra la rabia *in vivo* (ratones) y el plásmido reportero *in vitro* (células J774).

3. La expresión de la pneumolisina recombinante fue positiva, ya que desde tiempos muy cortos se encontró actividad lítica hasta en una dilución 1:27 y 1:243 en tiempos largos.

4. Con el empleo de la bacteria como acarreador del plásmido vacunal se alcanzaron niveles protectores de anticuerpos antirrábicos en ratones, aunque menores a los informados con la aplicación intramuscular.

5. *In vivo*, el empleo de la pneumolisina promueve la presencia de anticuerpos antirrábicos neutralizantes durante más tiempo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aguilar-Setién A & Loza-Rubio E (1999) El árbol genealógico de la rabia en México. *Ciencia y Desarrollo* **146**, 17-23.

2. Alexander J E, Lock R A, Peeters C C A M, Poolman J T, Andrew P W, Mitchel T J, Hansman D, & Paton J C (1994) Immunization of mice with pneumolisyn toxid confers a singnificant degree of protection againts at least nine serotypes of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **62**, 5683-5688.

3. Andrews N W & Portnoy D A (1994) Cytolysins from intracellular pathogens. *Trends in Microbiology* **2**, 261-263.

4. Anjam Khan C M, Villareal-Ramos B, Pierce R J, Riveau G, Demarco R H, McNeill H, Ali T, Fairweather N, Chatfield S, Capron A, Dougan G, & Hormaeche C E (1994) Construction, expression, and immunogenicity of *Schistosoma mansoni* P28 glutathione S-transferase as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C in a live Aro attenuated vaccine strain of *Salmonella*. *Proc Natl Acad Sci* **91**, 11261-11265.

5. Babiuk S, Mookherjee N, Pontarollo R, Griebel P, Littel-Van Den Hurk S V D, Hecker R, & Babiuk L (2004) $TLR9^{-/-}$ and $TLR9^{+/+}$ mice display similar immune responses to a DNA vaccine. *Immunology* **113**, 114-120.

6. Badrane H, Bahloul C, Perrin P, & Tordo N (2001) Evidence of Two Lyssavirus Phylogroups with Distinct Pathogenicity and Immunogenicity. *Journal of Virology* **75**, 3268-3276.

7. Baer G M & Smith J S (1991) Rabies in non-hematophagous bats. In: *The Natural History of Rabies* (ed. Baer G M), p. -341 CRC Press, Boca Raton, FL.

8. Bahloul C. Immunisation Génique: Immunogénicité de la Glycoprotéine Rabique et Vaccins Élargis aux Lyssavirus. 1-181. 1997. Université Paris XI. 3-10-1997. Ref Type: Thesis/Dissertation

9. Bahloul C, Jacob Y, Tordo N, & Perrin P (1998) DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. *Vaccine* **16**, 417-425.

10. Bahloul C, Hadj Ahmed S B, B'chir B I, Kharmachi H, Hayouni E A, & Dellagi K (2003) Post-exposure therapy in mice against experimental rabies: a single injection of DNA vaccine is as effective as five injections of cell culture-derived vaccine. *Vaccine* **22**, 177-184.

11. Bielecki J, Youngman P, Connelly P, & Portnoy D A (1990) *Bacillus subtilis* expressing a haemolysin gene from *Listeria monocytogenes* can grow in mammalian cells. *Nature* **345**, 175-176.

12. Bonev B B, Gilbert R J C, Andrew P W, Byron O, & Watts A (2001) Structural analysis of the protein/lipid complexes associated with pore formation by the bacterial toxin pneumolysin. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 5714-5719.

13. Bourhy H & Sureau P (1996) *Methodes de Laboratoire pour le Diagnostic de la Rage*, Comisión des laboratiores de reference et D'expertise de L'Intitute Pasteur, Paris, France.

14. Bunschoten H, Dietzschold B, Claassen I, Klapmuts R, Uytdehaag F, & Osterhaus A (1990) Rabies virus cross-reactive murine T cell clones: analysis of helper and delayed-type hypersensitivity function. *Viral Immunol* **3**, 41-53.

15. Castignolles N, Morgeaux S, Gontier-Jallet C, Samain D, Bedneder D, & Perrin P (1996) A new family of carries (biovectors) enhaces the immunogenicity of rabies antigens. *Vaccine* **14**, 1353-1360.

16. Celis E, Ou D, Dietzschold B, & Koprowski H (1988) Recognition of rabies and rabies-related virus by T cells derived from human vaccine recipients. *J Virol* **62**, 3128-3134.

17. Chabalgoity J A, Moreno M, Carol H, Dougan G, & Hormaeche C E (2000) *Salmonella typhimurium* as a basis for a live oral *Echinococcus granulosus* vaccine. *Vaccine* **19**, 460-469.

18. Cichutek K (2000) DNA Vaccines: Development, Standardization and Regulation. *Intervirology* **43**, 331-338.

19. Cochlovius B, Stassar M J J G, Scheurs M W, Benner A, & Adema G J (2002) Oral DNA vaccination: antigen uptake and presentation by dendritic cells elicits protective immunity. *Immunology Letters* **80**, 89-96.

20. Cossart P & et al. (1989) Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: direct evidence obtained by gene complementation. *Infect Immun* **57**, 3629-3636.

21. Coulon P, Derbin C, Kucera P, Lafay F, Prehaud C, & Flamand A (1989) Invasion of the peripheral nervous systems of adult mice by the CVS strain of rabies virus and its avirulent derivative AvO1. *Journal of Virology* **63**, 3550-3554.

22. Cox J H, Dietzschold B, & Schneider L (1977) Rabies virus glycoprotein. II Biological and serological characterization. *Infect Immunity* **16**, 754-759.

23. de los Toyos J R, Méndez F J, Aparicio J F, Vázquez F, García M S, Fleites A, Hardisson C, Morgan P J, Andrew P W, & Mitchell T J (1996) Functional analysis of pneumolysin by use of monoclonal antibodies. *Infection and Immunity* **64**, 480-484.

24. De Mattos C A, De Mattos C C, Smith J S, Miller E T, Papo S, Utrera A, & Osburn B I (1996) Genetic characterization of rabies fields isolates from Venezuela. *J Clin Microbiol* **34**, 1553-1558.

25. De Mattos C C, De Mattos C A, Loza-Rubio E, Aguilar-Setién A, Orciari L A, & Smith J S (1999) Molecular characterization of rabies virus isolates from Mexico: implications for transmission dynamics and human risk. *Am J Trop Med Hyg* **61**, 587-597.

26. Decatur A L & Portnoy D A (2000) A PEST-like sequence in Listeriolysin O essential for *Listeria monocytogenes* pathogenicity. *Science* **290** , 992-995.

27. Delagneau J F, Perrin P, & Atanasiu P (1981) Structure of rabies virus: spacial relationships of the protein G, M1, M2 and N. *Ann Virol (Inst Pasteur)* **132E**, 473.

28. Desmézieres E, Jacob Y, Saron M-F, Delpeyroux F, Tordo N, & Perrin P (1999) Lyssavirus glycoproteins expressing immunologically potent foreing B cell and cytotoxicT lymphocyte epitopes as prototypes for multivalent vaccines. *Journal of General Virology* **80**, 2343-2351.

29. Dietrich G, Bubert A, Gentschev I, Sokolovic Z, Simm A, Catic A, Kauffman S H E, Hess J, Szalay A A, & Goebel W (1998) Delivery of antigen-encoding plasmid DNA into the cytosol of macrophages by attenuated suicide *Listeria monocytogenes*. *Nature Biotechnology* **16**, 181-185.

30. Dietrich G, Kolb-Mäurer A, Spreng S, Schartl M, Goebel W, & Gentschev I (2001) Gram-positive and Garm-negative bacteria as carrier systems for DNA vaccines. *Vaccine* **19**, 2506-2512.

31. Dietrich G, Hess J, Gentschev I, Knapp B, Kauffman S H E, & Goebel W (2001) From evil to good: a cytolysin in vaccine development. *Trends in Microbiology* **9**, 23-28.

32. Dietzschold B, Cox J, Schneider L, Wiktor J, & Koprowski H (1978) Isolation and purification of a polymeric form of the glycoprotein of rabies virus. *J gen Virol* **40** , 131-139.

33. Dietzschold B, Wiktor T, Wunner W H, & Varrichio A (1983) Chemical and immunological analysis of the rabies soluble glycoprotein. *Virol* **124**, 330-337.

34. Dietzschold B, Wunner W H, Tadeusz J W, Lopes D, Lafon M, Smith C L, & Koprowski H (1983) Characterization of an antigenic determinant of the rabies glycoprotein that correlates with pathogenicity of rabies virus. *Proc Natl Acad Sci USA* **80**, 70-74.

35. Dietzschold B, Lafon M, Wang H, Otvos L, Celis E, Wunner W H, & Koprowski H (1987) Localization and immunological characterization of antigenic domains of the rabies virus internal N and NS proteins. *Virus Research* **8**, 103-125.

36. Dietzschold B, Wang H, Rupprecht C E, Celis E, Tollis M, Ertl H C, Herber-Katz E, & Koprowski H (1987) Induction of protective immunity against rabies with immunization rabies virus ribonucleoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 9165-9169.

37. Díaz A M, Papo S, Rodríguez A, & Smith J S (1994) Antigenic analysis of rabies-virus isolates from Latin American and the Caribbean. *J Vet Med Ser* **41**, 153-160.

38. Dorfman N, Dietzschold B, Kajiyama W, Fu Z F, Koprowski H, & Notkins A L (1994) Development of human monoclonal antibodies to rabies. *Hybridoma* **13**, 397-402.

39. Dumonteil E (2000) Vacunas de DNA: el presente y el futuro. *Rev Biomed* **11 (Supl 1)**, S7-S12.

40. Ertl H C (1989) Dominant T-helper cell epitopes of the rabies virus nucleoprotein. In: *Rabies* (ed. O Thraenhart., et al., & Wells Medical), Limited edn, p. 238 England.

41. Ertl H C, Dietzschold B, Gore M, Otvos L Jr, Larson J K, Wunner W H, & Koprowski H (1989) Induction of rabies virus specific T-helper cells by synthetic peptides that carry dominant T-helper cell epitopes of the viral ribonucleoprotien. *J Virol* **63**, 2885-2892.

42. Favi M, Yung V, Pavletic C, Ramírez E, De Mattos C C, & De Mattos C A (1999) Role in insectivorous bats in the transmission of rabies in Chile. *Arch Med Vet* **31**, 157-165.

43. Fló J, Tisminetzky S, & Baralle F (2001) Oral transgene vaccination mediated by attenuated Salmonellae is an effective method to prevent Herpes simplex virus-2 induced disease in mice. *Vaccine* **19**, 1772-1782.

44. Fuenzalida E & Palacios R (1955) Rabies vaccine prepared from brains of infected suckling mice. *Biol Inst Bacteriol* **8**, 3-10.

45. Garmory H S, Griffin K F, Leary S E C, Perkins S D, Brown K A, & Titball R W (2002) The effect of recombinant plasmids on in vivo colonisation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium strains is not reflected by in vitro cellular invasion assays. *Vaccine* **20**, 3239-3243.

46. Garmory H S, Brown K A, & Titball R W (2003) DNA vaccines: improving expression of antigens. *Genetic vaccines and therapy* **1**, 2.

47. Gaudin Y, Ruigrok R W, Tuffereau C, Knossow M, & Flamand A (1992) Rabies virus glycoprotein is a trimer. *Virology* **187**, 627-632.

48. Gaudin Y (1997) Folding of Rabies Virus Glycoprotein: Epitope Acquisition and Interaction with Endoplasmic Reticulum Chaperones. *Journal of Virology* **71**, 3742-3750.

49. Gentschev I, Dietrich G, Spreng S, Kolb-Mäurer A, Daniels J, Hess J, Kauffman S H E, & Goebel W (2000) Delivery of protein antigens and DNA by virulence-attenuated strains of *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Biotechnology* **83**, 19-26.

50. Gilbert R J, Jiménez J L, Chen S, Tickle I J, Rossjohn J, Parker M, Andrew P W, & Saibil H R (1999) Two structural transitions in membrane pore formation by pneumolysin, the pore-forming toxin of *Streptococcus pneumoniae*. *Cell* **97**, 647-655.

51. Goebel W & Kreft J (1997) Cytolysins and the intracellular life of bacteria. *Trends in Microbiology* **5**, 86-88.

52. Gurunathan S, Klinman D M, & Seder R A (2000) DNA VACCINES: Immunology, Application and Optimization. *Annu Rev Immunol* **18**, 927-974.

53. Herzog M, Lafage M, Montaño-Hirose J A, Fritzell C, Scott-Algara D, & Lafon M (1992) Nucleocapsid specific T and B cell responses in humans after rabies vaccination. *Virus Research* **24**, 77-89.

54. Hoiseth S K & Stocker B A (1981) Aromatic-dependent *Salmonella typhimurium* are non-virulent and as efective live vaccines. *Nature* **291**, 238-239.

55. Hooper D C, Pierard I, Modelska A, Otvos L Jr, Fu Z F, Koprowski H, & Dietzschold B (1994) Rabies ribonucleocapsid as an oral immunogen and immunological enhancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 10908-10912.

56. Irie T, Matsuda Y, Honda Y, Morimoto K, & Kawai A (2002) Studies on the Escape Mutants of Rabies Virus Wich Are Resistant to Neutralization by a Highly Conserved Conformational Epitope-Specific Monoclonal Antibody #1-46-12. *Microbiol.Immunol.* **46**, 449-461.

57. Jain V & Mekalanos J J (2000) Use of lambda phage S and R gene products in an inducible lysis system for *Vibrio cholerae*- and *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium-based DNA vaccina delivery systems. *Infection and Immunity* **68**, 986-989.

58. Jallet C, Jacob Y, Bahloul C, Drings A, Desmézieìres E, Tordo N, & Perrin P (1999) Chimeric lyssavirus glycoproteins with increased immunological potential. *Journal of Virology* **73**, 225-233.

59. Johnson N, Mansfield K L, & Fooks A R (2002) Canine vaccine recipients recognize an immunodominant region of the rabies virus glycoprotein. *Journal of General Virology* **83**, 2663-2669.

60. Kauffman S H E (1998) Immunity to intracellular bacteria. In: *Fundamental Immunology* (ed. Paul W E), p. 1335-1371 Lippincott-Raven.

61. Kelly S J & Jedrzejas M J (2000) Structure and molecular mechanism of funtional form of Pneumolysin: A cholesterol-dependent cytolysin from *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of structural biology* **132**, 72-81.

62. Laemmli U K (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.

63. Lafon M & Wiktor T (1985) Antigenic sites on the ERA rabies virus nucleoprotein and non-structural protein. *J gen Virol* **66**, 2125-2133.

64. Lafon M, Lafage M, Martínez-Arends A, Ramírez R, Vuillier F, Charron D, Lotteau V, & Scott-Algara D (1992) Evidence for a viral superantigen in humans. *Nature* **358**, 507-510.

65. Lagrange P H, Tsiang H, Hurtrel B, & Ravisse P (1978) Delayed-type hypersensitivity to rabies virus in mice: assay of active or passive sensitization by the footpad test. *Infect Immunity* **21**, 931-939.

66. Larson J K, Wunner W H, Otvos L, & Ertl H C (1991) Identification of an immunodominant epitope withinthe phosphoprotein of rabies virus that is recognized by both class I- and class II- restricted T cells. *J Virol* **65**, 5673-5679.

67. Larson J K, Wunner W H, & Ertl H C (1992) Immune response to the nominal phosphoprotein of rabies virus. *Virus Research* **23**, 73-88.

68. Lodmell D L & Ewalt L C (2000) Rabies vaccination: comparison of neutralizing antibody responses after priming and boosting with diffrerent combination of DNA, inactivated virus, or recombinant vaccinia virus vaccines. *Vaccine* **18**, 2394-2398.

69. Lodmell D L, Ray N B, Ulrich J T, & Ewalt L C (2000) DNA vaccination of mice against rabies virus: effects of the route vaccination and the adjuvant monophosphoryl lipid A (MLP®). *Vaccine* **18**, 1059-1066.

70. Lodmell D L, Parnell M J, Weyhrich J T, & Ewalt L C (2003) Canine rabies DNA vaccination: a single-dose intradermal injection into ear pinnae elicits elevated and pesistent levels of neutralizing antibody. *Vaccine* **21**, 3998-4002.

71. Loza-Rubio E, Aguilar-Setién A, Bahloul C, Brochier B, Pastoret P P, & Tordo N (1999) Discrimination Between Epidemiological Cycles of Rabies in Mexico. *Archives of Medical Research* **30**, 144-149.

72. MacFarlan R, Dietzschold B, Wiktor T J, Kiel M, Houghten R, Lener R, Sutcliffe G, & Koprowski H (1984) T cell responses to cleaved rabies virus glycoprotein and to synthetic peptides. *J Immunol* **133**, 2748-2752.

73. MacFarlan R, Dietzschold B, & Koprowski H (1986) Stimulation of cytotoxic T-lymphocyte response by rabies virus glycoprotein and identification of an immunodominant domain. *Mol Immunol* **23**, 733-741.

74. McVey D S, Chengappa M M, Mosier D E, Stone G G, Oberst R D, Sylte M J, Gabbert N M, Kelly-Aehle S M, & Curtiss III R (2002) Immunogecity of X^{4127} *phoP-Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* in dogs. *Vaccine* **20**, 1618-1623.

75. Mitchell T J, Andrew P W, Saunders F K, Smith A N, & Boulnois G J (1991) Complement activation and antibody binding by pneumolisyn via a region of the toxic homologous to a human acute phase protein. *Mol Microbiol* **5**, 1883-1888.

76. Mollenkopf H-J, Groine-Triebkorn D, Andersen P, Hess J, & Kauffman S H E (2001) Protective efficacy against tuberculosis of ESAT-6 secreted by a live *Salmonella typhimurium* vaccine carrier strain and expressed by naked DNA. *Vaccine* **19**, 4028-4035.

77. Organización Panamericana de Salud (2000) *Boletín de Vigilancia Epidemiológica de la Rabia en las Américas*, 1-36.

78. Osorio J E, Tomlinson C C, Frank R S, Haanes E J, Rushlow K, Haynes J R, & Stinchcomb D T (1999) Immunization of dogs and cats with a DNA vaccine against rabies virus. *Vaccine* **17**, 1109-1116.

79. Pasteur L, Roux E, Chamberland C, & Thullier L (1881) Sur la rage. *CR Hedb Séanc Acad Sci* **98**, 1229-1231.

80. Pasteur L (1885) Méthodes pour prévenir la rage aprés morsure. *CR Hedb Séanc Acad Sci* **101**, 765-772.

81. Pastoret P P, Brochier B, Aguilar-Setién A, & Blancou J (1997) Vaccination against rabies. In: *Veterinary Vaccinology* (ed. Pastoret P P, Blancou J, Vannier P, & Verschueren C), p. 616-628 Elsevier, The Netherlands.

82. Paton J C, Andrew P W, Boulnois G J, & Mitchell T J (1993) Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: The role of pneumococcal proteins. *Annu Rev Microbiol* **47**, 89-115.

83. Perrin P, Thibodeau L, & Sureau P (1985) Rabies immunosomes (subunit vaccine) structure and immunogenicity. Pre- and post- exposure protection studies. *Vaccine* **3**, 325-332.

84. Perrin P, Joffret M -L, Oth D, Leclerc C, Sureau P, & Thibodeau L (1988) Interleukine-2 production in vitro: a new approach to the study of rabies vaccine immunogenicity as appraised by testing different glycoprotein presentations. *Vaccine* **6**, 331-338.

85. Perrin P, Jacob Y, Aguilar-Setién A, Loza-Rubio E, Jallet C, Desmézieİres E, Aubert M, Cliquet F, & Tordo N (2000) Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine* **18**, 479-486.

86. Portnoy D A, Chakraborty T, Goebel W, & Cossart P (1992) Molecular determinants of *Listeria monocytogenes* pathogenesis. *Infect Immun* **60**, 1263-1267.

87. Prehaud C, Coulon P, Lafay F, Thiers C, & Flamand A (1988) Antigenic site II of rabies virus glycoprotein: structure and role in viral virulence. *Journal of Virology* **62**, 1-7.

88. Ray N B, Ewalt L C, & Lodmell D L (1997) Nanogram quantities of plasmid DNA encoding the rabies virus glycoprotein protect mice against lethal rabies virus infection. *Vaccine* **15**, 892-895.

89. Robinson H L, Hunt L A, & Webster R G (1993) Protection against a lethal influenza virus challenge by immunization with a haemagglutinin-expressing plasmid DNA. *Vaccine* **11**, 957-960.

90. Rubins J B & Janoff E N (1998) Pneumolysin: A multifunctional pneumococcal virulence factor. *J Lab Clin Med* **131**, 21-27.

91. Ruiz-Pérez F. Construcción de una cepa vacunal de Salmonella enterica como vehículo eficiente en la inmunización con proteínas y DNA heterólogos. 1-149. 2002. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional. Ref Type: Thesis/Dissertation

92. Ruiz-Pérez F, León-Kempis R, Santiago-Machuca A, Ortega-Pierres G, Barry E, Levine M M, & González-Bonilla C (2002) Expression of the Plasmodium falciparum immunodominant epitope $(NANP)_4$ on the Surface of *Salmonella enterica* using the autotransporter MisL. *Infection and Immunity* **70**, 3611-3620.

93. Salas-Rojas M, Sánchez-Hernández C, Romero-Almaraz M L, Schnell G D, Kretschmer R S, & Aguilar-Setién A (2004) Prevalence of rabies and LPM paramyxovirus antibody in non-hematophagous bats captured in the Central Pacific coast of Mexico. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygine* **98**, 577-584.

94. Sambrook J & Russell D W (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York, USA.

95. Secretaría de Salud, SSA. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. Sistema Único de Información. 18[16], 3. 2001.

96. Seif I, Coulon P, Rolling P E, & Flamand A (1985) Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein. *Journal of Virology* **53**, 926-934.

97. Semple D (1911) The preparation of safe and efficient antirabic vaccine. *Sci Mem Med Sanit Dept Gout India Bull Inst Pasteur* **9**, 701.

98. Shata M T, Stevceva L, Agwale S, Lewis G K, & Hone D M (2000) Recent advances with recombinant bacterial vaccine vectors. *Molecular Medicine Today* **6**, 66-71.

99. Shata M T, Reitz Jr M S, DeVico A L, Lewis G K, & Hone D M (2001) Mucosal and systemic HIV-1 Env-specific $CD8^+$ T-cells develop after intragastric vaccination with a *Salmonella* Env DNA vaccine. *Vaccine* **20**, 623-629.

100. Sokol F, Stancek D, & Koprowski H (1971) Structural proteins of rabies virus. *J Virol* **7**, 241-249.

101. Soo S S, Villareal-Ramos B, Anjam Khan C M, Hormaeche C E, & Blackwell J M (1998) Genetic control of immune response to recombinant antigans carried by an attenuated *Salmonella typhimurium* vaccine strain: *Nramp1* influences T-helper subset responses and protection against leishmanial challenge. *Infection and Immunity* **66**, 1910-1917.

102. Spreng S, Dietrich G, Niewiesk S, ter Meulen V, Gentschev I, & Goebel W (2000) Novel bacterial system for the delivery of the recombinant protein or DNA. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **27**, 299-304.

103. Tacket C O, Kelly S M, Schödel F, Losonsky G, Nataro J P, Edelman R, Levine M M, & Curtiss III R (1997) Safety and immunogenicity in humans of attenuated *Salmonella typhi* vaccine vector strain expressing plasmid-encoded Hepatitis B antigens stabilized by the Asd-balance lethal vectos system. *Infection and Immunity* **65**, 3381-3385.

104. Tang D C, De Vit M, & Johnston S A (1992) Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* **356**, 152-154.

105. Titball R W, Howells A M, Oyston P C F, & Williamson E D (1997) Expression of the *Yersenia pestis* capsular antigen (F1 antigen) an the surface of an *aroA* mutant of *Salmonella typimurium* induces high levels of protection against plague. *Infection and Immunity* **65**, 1926-1930.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

106. Tollis M, Dietzschold B, Voila C B, & Koprowski H (1991) Immunization of monkeys with rabies ribonucleoprotein (RNP) confers protective immunity against rabies. *Vaccine* **9**, 134-136.

107. Tordo N (1993) Rhabdoviruses: Virus de la Rage. In: *Virologie Medicale* (ed. R Crainic & J -C Nicolas), p. 317-333 Paris, France.

108. Tordo N, Bourhy H, Sather S, & Ollo R (1993) Structure and expression in the baculovirus of the Mokola virus glycoprotein: an efficient recombinant vaccine. *Virology* **194**, 59-69.

109. Tordo N, Charlton K, & Wandeler A (1998) Rhabdoviruses: rabies. In: *Topley & Wilson´s Microbiology and Microbial Infections* (ed. L.H.Collier), p. 665-692 Arnold, London.

110. Tsiang H & Lagrange P H (1980) In vivo detection of specific cell-mediated immunity in street rabies virus infection in mice. *J gen Virol* **47**, 183-191.

111. Tüting T, Austyn J, Storkus W J, & Falo Jr L D (1999) The Immunology of DNA Vaccines. In: *DNA Vaccines: Methods and Protocols* (ed. Lowrie D B & Whalen R G Human Press Inc.), Vol. 29, p. 37-63 Totowa, NJ.

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

113. Van der Walt M L, Vorster J H, Steyn H C, & Greeff A S (2001) Auxotrophic, plasmid-cured *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* for use as a live vaccine in calves. *Veterinary Microbiology* **80**, 373-381.

114. Vecino W H, Morin P M, Agha R, Jacobs Jr W R, & Fennelly G J (2002) Mucosal DNA vaccination with highly attenuated *Shigella* is superior to attenuated *Salmonella* and comparable to intramuscular DNA vaccination for T cells against HIV. *Immunology Letters* **82**, 197-204.

115. Vega M I, Santos-Argumedo L, Huerta-Yepez S, Luría-Pérez R, Ortiz-Navarrete V, Isibasi A, & González-Bonilla C (2003) A *Salmonella typhi* OmpC fusion protein expressing the CD154 Trp140-Ser149 amino acid strand binds CD40 and activates a lymphoma B-cell line. *Immunology* **110**, 206-216.

116. Velasco-Villa A, Gómez-Sierra M, Hernández-Rodriguez G, Juárez-Islas V, Meléndez-Félix A, Vargas-Pino F, Velázquez-Monroy O, & Flisser A (2002) Antigenic Diversity and Distribution of Rabies Virus in México. *Journal of Clinical Microbiology* **40**, 951-958.

117. Verma N K, Ziegler H K, Wilson M, Khan M, Safley S, Stocker B A D, & Schoolnik G K (1995) Delivery of class I and II MHC-restricted T-cell epitopes of listeriolysin of *Listeria monocytogenes* by attenuated *Salmonella*. *Vaccine* **13**, 142-150.

118. Warner C K, Zaki S R, Shieh W J, Whitfield S G, Smith J S, Orciari L A, Shaddock J H, Niezgoda M, Wright C W, Goldsmith C S, Sanderlin D W, Yager P A, & Rupprecht C E (1999) Laboratory investigation of human deaths from vampire bats rabies in Peru. *Am J Trop Med Hyg* **60**, 502-507.

119. Weeratna R D, McCluskie M J, Comanita L, Wu T, & Davis H L (2000) Optimization Strategies for DNA Vaccines. *Intervirology* **43**, 218-226.

120. Whitt M, Buonocore L, Prehaud C, & Rose J (1991) Membrane fusion activity, oligomerization and assembly of the rabies virus glycoprotein. *Virol* **185**, 681-688.

121. Wiktor T J, Gyorgy E, Schlumberger H D, Sokol F, & Koprowski H (1973) Antigenic properties of rabies virus components. *J Immunol* **110**, 269-276.

122. Wiktor T J, Doherty P, & Koprowski H (1977) In vitro evidence of cell-medieted immunity after exposure of mice to both live and inactivated rabies vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**, 334-338.

123. Wiktor T J, MacFarlan R, Reagan K, Dietzschold B, Curtis P, Wunner W H, Kieny M P, Lathe R, Lecocq J -P, Mackett M, Moss B, & Koprowski H (1984) Proteccion from rabies by a vaccinia virus recombinant containing the rabies virus glycoprotein gene. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**, 7194-7198.

124. Wojczyk B, Shakin-Eshleman S H, Doms R W, Xiang Z Q, Ertl H C, Wunner W H, & Spitalnik S L (1995) Stable secretion of a soluble, oligomeric form of rabies virus glycoprotien: influence of N-glycan processing on secretion. *Biochem* **34**, 2599-2609.

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

126. Woo P C Y, Wong L, Zheng B, & Yuen K (2001) Unique immunogenicity of hepatitis B virus DNA vaccine presented by live-attenuated *Salmonella typhimurium*. *Vaccine* **19**, 2945-2954.

127. Xiang Z Q, Spitalnik S L, Cheng J, Erikson J, Wojczyk B, & Ertl H C (1995) Immune response to nucleic acid vaccine to rabies virus. *Virology* **209**, 569-579.