

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ESTUDIO DEL VIRUS RECOMBINANTE MEL-1 EN RATONES

BALB/C

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

PRESENTA

RODRIGO ROJAS AVALOS

DIRECTORA DE TESIS: DR. RICARDO ROSALES LEDEZMA

MÉXICO D.F.

FEBRERO 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 5 de Noviembre de 2007, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del alumno **ROJAS AVALOS RODRIGO** con número de cuenta **93385583** con la tesis titulada "**Estudio del virus recombinante MEL-1 en ratones Balb/c**", realizada bajo la dirección del **DR. RICARDO ROSALES LEDEZMA**.

Presidente: DR. CELSO RAMOS GARCÍA
Vocal: DR. FERNANDO LÓPEZ CASILLAS
Secretario: DR. RICARDO ROSALES LEDEZMA
Suplente: DRA. BLANCA HAYDÉ RUIZ ORDAZ
Suplente: DR. LUIS PADILLA NORIEGA

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

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a, 11 de Diciembre de 2007.


Dr. Juan Núñez Farfán
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado.

Agradecimientos

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al CONACYT por la beca otorgada.

A la Dra. Blanca Haydé Ruíz Ordaz

Al Dr. Celso Ramos García

Al. Dr. Ricardo Rosales

Dedicatoria

A mi Flor, por una hermosa vida juntos.

A mi Ma y a mi Pa, por su amor, por su ejemplo.

A Loncho, por ser mi mejor amigo.

A mi Abue, a mi tía Lila a Fer y a Laura, por su apoyo y cariño.

Espero haberles hecho saber con el trato cotidiano, el porque les dedico mi tesis.

Agradecimientos

Al Dr. Ricardo Rosales Ledezma por su apoyo y confianza durante la realización de ésta tesis.

A la Dra. Blanca Ruíz Ordaz y al Dr. Celso Ramos García por su apoyo en la dura cuesta final.

Al Dr. Luís Padilla por la revisión de la tesis.

A la Dra. María Luisa por la ayuda en el procesamiento de los órganos.

Al M.V.Z. Gerardo Arrellín por su ayuda con las necropsias de los animales.

Al Dr. Enrique Aburto por su ayuda en la interpretación de los cortes histológicos y análisis sanguíneos.

A mi ahora desmembrada banda.

A mi queridísima suegrita, a Claudia y Yaneli, y a Ruth, Vicente y Miguel.

A Aldo y Flavio por los juegos y la amistad.

A Erick y Tania por una amistad que espero cultivemos.

A David, Eloisa, Yayr, Guadalupe, Dr. Juvencio, Guille, Mina, Marisol, Gaby y Pepe por su apoyo.

Al Dr. Estrada por su apoyo.

Índice

Resumen	5
Abreviaciones	7
Introducción	8
Materiales y métodos	18
Objetivos	33
Hipótesis	34
Resultados	35
Discusión	48
Conclusiones	55
Sugerencias	56
Bibliografía	57

Resumen

MEL-1 es un virus recombinante obtenido al insertar el gen E2 del virus del papiloma bovino en un vector MVA (virus de la vaccinia modificado). Este recombinante está diseñado para estimular una respuesta inmune específica contra el cáncer cervicouterino. En ratones atímicos portadores de un tumor humano, la inoculación de MEL-1 disminuye significativamente la velocidad de crecimiento del tumor, mientras que en conejos inmunocompetentes lo elimina por completo. En ninguno de estos modelos MEL-1 provoca reacciones adversas importantes, es sin embargo necesario determinar su inocuidad debido a que es usado en humanos.

Grupos de ratones Balb/c fueron inoculados subcutáneamente con tres diferentes dosis del virus MEL-1. Por la duración del experimento fueron pesados, se determinó su temperatura, fue registrado su consumo de alimento y cambios conductuales. Al finalizar el experimento varios ratones fueron anestesiados y se les tomó una muestra de sangre por punción cardíaca, con esas muestras se realizó un hemograma y una bioquímica sanguínea. Los órganos de varios ratones fueron procesados y se obtuvieron cortes semifinos a los cuales se les realizó una inmunohistoquímica para determinar la presencia del virus MEL-1.

No se detectaron alteraciones significativas en el peso de ninguno de los ratones aún en las dosis más altas, respecto al grupo control. Ninguno de los animales presentó alteraciones en su consumo de alimento ni conductuales atribuibles a la inoculación del virus. Los cortes semifinos de los órganos de ratones inoculados con la máxima dosis del virus no mostraron alteraciones en el tejido al ser revisados al microscopio, adicionalmente, no fue posible detectar componentes virales en ninguno de los órganos de los ratones analizados, ni alteraciones en las poblaciones celulares o en la bioquímica

sanguínea atribuibles a efectos directos o indirectos del virus. Por ello se concluye que MEL-1 no provoca reacciones adversas al ser inoculado a ratones Balb/c.

Abreviaciones

ADN	Acido desoxirribonucleico
NIC	Neoplasia intraepitelial del cervix
ufp	Unidades formadoras de placa
VPH	Virus del papiloma humano
LTC	Linfocitos T citotóxicos
VPB	Virus del papiloma bovino
MVA	Virus de la vaccinia modificado
mdi	Multiplicidad de infección
rpm	Revoluciones por minuto
ALT	Alaninamino transferasa
AST	Aspartatoamino transferasa
CaCU	Cáncer cervicouterino
WR	Virus vaccina Western Reserve
Kb	Kilobases de ADN
PF	Paraformaldehído

Introducción

Cáncer cervicouterino y virus del papiloma humano

El cáncer cervicouterino (CaCU) es el segundo cáncer más común entre las mujeres en el mundo con un estimado de 493,000 casos nuevos y 274,000 muertes durante el 2002¹. Recientemente sobrepasó al cáncer mama como la causa número uno de muertes por cáncer de mujeres en México. Es por ello que actualmente se reconoce que el CaCU es un importante determinante de la mortalidad de la mujer en países subdesarrollados².

Numerosos estudios epidemiológicos vinculan a la infección de algunos tipos de VPH con la aparición de neoplasias del cervix (NIC) o con la progresión hacia el CaCU. Otros estudios han encontrado que aproximadamente 99.7% de los casos de CaCU o NIC contienen ADN de VPH³, por lo cual, se cree que el VPH es un factor necesario aunque no suficiente para el desarrollo de la enfermedad⁴. Otros cofactores que se ha determinado tienen participación en el desarrollo de la enfermedad son: múltiples partos a término, uso prolongado de anticonceptivos orales, tabaquismo y coinfección con otros agentes sexualmente transmitidos, mientras que factores tales como: edad de la primera exposición al VPH, número de parejas sexuales, uso de condón, higiene genital y circuncisión afectan las posibilidades de que se establezca una infección latente⁵.

Los serotipos -16, -18, -31, -33 y -35 del virus son los más comunes causantes de CaCU a nivel mundial. Además de este cáncer otros serotipos del VPH se encuentran asociados en menor o mayor medida a cánceres de vagina (60% son positivos a ADN de VPH), ano (46-94%), pene (15% a 71%)⁶, cánceres de esófago, traquea, laringe, pulmón y senos nasales^{7, 8}. Recientemente se ha comenzado a relacionar al VPH-4 y algunos otros serotipos cercanos con el desarrollo de carcinomas de piel no melanómicos⁹.

El VPH es un virus no envuelto que consiste en ADN circular de doble cadena de 8 kilobases empaquetado dentro de una cápside proteica icosaédrica compuesta de dos proteínas (L1 y L2). Además de L1 y L2, el genoma codifica para otras seis proteínas tempranas que son requeridas para la replicación de ADN viral y el ensamblaje de nuevas partículas dentro de las células (E1, E2 y E4-E7). Ambos conjuntos de genes están separados por una región regulatoria superior (URR) que contiene elementos para la regulación de la expresión, la replicación del genoma y su ensamblaje. Los papilomavirus están adaptados a infectar y proliferar en células del epitelio de piel o mucosas.

El ciclo de vida del virus está ligado al programa de diferenciación de la célula infectada, el queratinocito, en los que la producción de viriones está restringida a células suprabasales diferenciadas. La infección del papilomavirus ocurre a través de lesiones microscópicas del epitelio que exponen las células de la capa basal a la entrada del virus. Las células en este compartimiento están en continua división y proveen un reservorio para los virus. La infección inicia una producción de 20 a 100 copias del ADN viral en cada célula, número que es mantenido en las células basales indiferenciadas a lo largo de la infección. Las células basales infectadas se dividen y algunas de ellas migran hacia el compartimiento suprabasal e inician el programa de diferenciación. Se activan entonces factores requeridos para la replicación viral. Esto provoca la retención de los núcleos y la conocida morfología del tejido. En algunos casos el genoma viral se encuentra en la forma de episoma, la proteína E2 controla negativamente la expresión de las oncoproteínas E6 y E7, pero accidentalmente el genoma viral se integra al celular. Esta integración provoca la interrupción del gen E2 y la ausencia de su expresión, lo cual a su vez, se traduce en un aumento en la expresión de altos niveles de E6 y E7.

Las proteínas E6 y E7 son responsables de la transformación de las células y del mantenimiento de este fenotipo. La proteína E6 se une a la proteína celular p53 y evita la apoptosis de la célula mediada por ésta, la proteína E7 liga a la pRB, lo que evita el bloqueo del crecimiento celular mediado por esta ruta^{10, 11}. El resultado general es la pérdida de control del ciclo celular. La proteína E1 es una helicasa capaz de unirse al sitio de replicación y reclutar a la proteína E2, aunque en virus del papiloma bovino la proteína E5 presenta una fuerte actividad transformadora, sin embargo no es necesaria para la transformación en la infección con VPH¹².

La actividad reguladora de la proteína E2 sobre E6 y E7, fue rápidamente vista como potencialmente terapéutica. Se pensó que dado las oncoproteínas eran necesarias para el mantenimiento del fenotipo transformado, su regulación negativa podría ser suficiente para detener el estado transformante. La dificultad radicaba entonces en poder llevar el gen E2 dentro de las células infectadas a la proteína misma o al gen que la codifica. El vector elegido para crear la vacuna recombinante MEL-1 fue una cepa altamente atenuada del virus de la vaccinia; el virus de la vaccinia modificado (MVA).

El virus de la vaccinia modificado (MVA)

El virus MVA es una cepa altamente atenuada del virus de la vaccinia, perteneciente al género de los *orthopoxvirus*, los que a su vez se encuentran dentro de la subfamilia de los *Chordopoxvirinae* en donde se agrupan virus que infectan a vertebrados, esta se halla agrupada junto con otras familias dentro de la familia de los *Poxvirus* ampliamente estudiada y cuyo miembro modelo es el virus de la vaccinia. Los viriones de esta familia poseen forma ovoide, su genoma es ADN de doble cadena, aproximadamente de 130 a 220 kb de longitud y contiene alrededor de 200 genes. El género *orthopoxvirus*

comprende al virus de la variola; agente infeccioso exclusivo de humanos, el virus de la viruela del camello, del mono, del mapache y al virus de la vaccinia (que infecta a numerosas especies de mamíferos; humano, cerdo, conejo, búfalo, etc.) entre otros¹³.

El ciclo de vida de este género inicia con la infección de la célula hospedero, seguida por la expresión de los genes virales que antecede a la replicación del ADN viral. La morfogénesis de este virus produce básicamente dos tipos de viriones¹⁴: Partículas intracelulares que representan la mayoría (89%) de los generados durante una infección productiva y extracelulares liberados al medio y representan un 11% de la progenie¹⁵.

El uso del virus de la vaccinia se remonta hasta el siglo XVIII cuando Edward Jenner empleó una cepa de este virus extraído de pústulas de vacas infectadas para inmunizar a personas contra la enfermedad causada por el virus de la variola, la viruela. Siglos después la Organización Mundial de La Salud empleó diversas cepas de vaccinia durante la Campaña Mundial de Erradicación de la Viruela. Las cepas empleadas eran relativamente seguras, en promedio registraban un caso de efectos adversos severos por cada 500,000 personas inmunocompetentes vacunadas, aunque significativamente más entre el subconjunto de personas inmunodeficientes vacunadas. Aun esta incidencia relativamente baja propició el desarrollo de cepas del virus mucho más atenuados pero que continuaran siendo suficientemente inmunogénicos para conferir protección. Una de las cepas resultantes de esta búsqueda fue la del virus de la vaccinia modificado (MVA). Esta cepa fue desarrollada a partir del virus Ankara (aislado de una pústula de caballo en una región de Turquía) ya por entonces extensivamente caracterizado. El virus fue atenuado cultivándolo en 576 pasajes sucesivos en cultivos de fibroblastos de embrión de pollo¹⁶ (FEP). El cultivo en FEP provocó deleciones en el genoma de MVA respecto a la cepa original (aproximadamente 31 kb), por lo que MVA perdió su capacidad para

multiplicarse productivamente en células de mamífero¹⁷, en las que la morfogénesis de los viriones se halla bloqueada en una etapa tardía del ciclo de vida^{18, 19}. El bloqueo tardío permite la producción normal de la mayoría de las proteínas virales, aun en células de mamífero, permitiendo a virus recombinantes una eficiente expresión de genes exógenos²⁰, así como la formación de partículas inmaduras.

MVA fue inoculado a más de 120,000 personas en Munich, Alemania, como parte de las campañas de vacunación durante el programa mundial de erradicación de la viruela²¹, incluido un numeroso grupo de pacientes inmunodeprimidos en riesgo ante la inmunización con otras cepas más virulentas de la empleadas en las campañas²². MVA ha conseguido un impresionante registro de eficacia y seguridad, no habiendo mostrado prácticamente ningún efecto adverso secundario²³.

La ausencia de toxicidad de este vector ha sido probada en estudios en los cuales el virus fue inoculado en altas dosis a macacos inmunosuprimidos, no pudiéndose detectar en un periodo de seguimiento de 13 días alteraciones clínicas, hematológicas o patológicas relacionadas. En este periodo de estudio pudo determinarse la presencia de ADN del virus pero no se recuperaron viriones competentes de los tejidos de los animales²⁴. Otros estudios emplean la pérdida de peso como indicador de efectos tóxicos; ratones SCID fueron inoculados con altas dosis de MVA (hasta 10^8 unidades formadoras de placas) no mostrando después de 140 días de seguimiento diferencias en la variación de peso respecto a grupos de ratones no inmunizados, aún cuando esta cepa de ratón presenta una severa inmunodeficiencia²⁵. Un estudio más exhaustivo buscó alteraciones clínicas, conductuales, histopatológicas o hematológicas debidas a la inmunización con una vacuna recombinante de ADN-MVA contra VIH en ratones Balb/c²⁶. La investigación no encontró alteraciones serias atribuibles a la administración de la vacuna.

La casi nula toxicidad y alta efectividad como vector de MVA ha motivado la realización de investigaciones en las que se estudió el destino del virus una vez introducido por alguna vía en diversos modelos, principalmente ratón. Un recombinante de MVA codificando el gen de la luciferasa fue inyectado por vía subcutánea (base de la cola) e intraperitoneal a ratones C57BL/6, después de 6, 24 y 48 horas, los animales fueron sacrificados y se determinó la actividad de luciferasa en varios órganos, se encontró una distribución diferenciada de su expresión: en los animales inoculados por vía subcutánea la actividad de la enzima se encontraba confinada a los nódulos linfáticos cercanos al sitio de inyección y también a los pulmones, mientras que una mas amplia distribución fue observada en los inyectados por vía intraperitoneal, en los que los una clara actividad fue detectada en ovarios, pulmones, placas de peyer, nódulos linfáticos mesentéricos, bazo y nódulo linfáticos cervical, inguinal y del hileo. La mayor actividad fue medida a las 24 horas, después de 48, no fue posible detectar ninguna señal²⁷.

Estos estudios demuestran que MVA puede ser empleado con seguridad como vector para la construcción de vacunas recombinantes humanas inclusive en individuos inmunodeficientes, así, en 2007, MVA fue autorizado por la Organización Mundial de la Salud como único vector ha ser empleado en la fabricación de vacunas contra la viruela.

Actualmente existen varias vacunas recombinantes desarrolladas empleando MVA como vector. Como ejemplo podemos mencionar (con diferente grado de desarrollo): Vacuna contra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) en la que se insertó el gen *gag* del virus de la inmunodeficiencia de simio en el virus MVA, ha probado la ausencia de efectos adversos aunque la efectividad al inducir una respuesta inmune protectora a sido significativamente menor a la de una construcción similar empleando un vector adenoviral²⁸.

Se desarrolló una vacuna terapéutica contra VIH, MVA-nef, en la cual el gen para la proteína viral reguladora Nef (requerida para el mantenimiento de altos niveles de replicación del VIH), fue insertado en MVA. Inyectada en portadores del VIH, mostró la inducción de una respuesta celular específica contra la proteína, por lo que puede ser útil en el tratamiento de la infección²⁹.

Una vacuna recombinante de MVA que incorpora a los genes de fusión y hemaglutinina del virus del sarampión, probó proteger efectivamente a macacos de un reto con una dosis infectiva del virus en presencia de anticuerpos contra sarampión transferidos pasivamente. El reto se realizó un año posterior a la inmunización³⁰.

Vacuna contra la toxoplasmosis MVA RP2. En esta, la proteína ROP2 de *Toxoplasma gondii* fue clonada en el vector MVA. Probada en ratones demostró la inducción de anticuerpos contra la proteína en niveles similares a la de una cepa termosensible de *T. gondii*, la cual puede proteger completamente a ratones contra un reto con el parásito, además, MVA ROP2 aumentó la expectativa de vida en animales retados³¹.

Se han llevado a cabo estudios clínicos de un esquema de inmunización contra la Malaria empleando una vacuna de ADN (DNA ME-TRAP) seguida por el refuerzo con un virus MVA recombinante (MVA ME-TRAP), los antígenos ME y TRAP son de esporozoitos de *Plasmodium falciparum*. La vacuna demostró ser segura y altamente eficiente en la inducción de una respuesta celular efectora en voluntarios no inmunes^{32, 33}.

Otras vacunas desarrolladas empleando MVA como vector son: contra influenza³⁴, tuberculosis³⁵ y virus sincicial respiratorio³⁶.

Como ejemplo final, el virus recombinante MEL-1 fue desarrollado como vacuna terapéutica contra el Cáncer Cervicouterino no invasivo.

El virus MEL-1

El virus recombinante MEL-1, fue construido empleando un plásmido que contenía una copia del gen E2 del virus del papiloma bovino controlado por un promotor sintético temprano / tardío del virus de la vaccinia ambos flanqueados por secuencias de recombinación homóloga. Este plásmido fue transfectado en fibroblastos de embrión de pollo previamente infectados con el virus MVA. Varios lotes de virus recombinantes fueron aislados infectando cultivos de FEP en presencia de ácido micofenólico como mecanismo de selección.

En un conjunto de experimentos previos conducidos por nuestro grupo, se buscó elucidar la actividad terapéutica del virus MEL-1 en ausencia de un sistema inmune. Grupos de ratones inmunodeficientes (atímicos) fueron inoculados por vía subcutánea con 2 millones de células de una línea de cáncer cervicouterino (HeLa). Cuando el tumor alcanzó entre 0.1 y 0.5 cm² fue inyectado semanalmente durante tres semanas con MEL-1, el vector original MVA o PBS como control negativo. Se determinó que la velocidad de crecimiento del tumor disminuyó significativamente en el grupo de ratones tratado con MEL-1, en contraste con el grupo inyectado con MVA, en el cual solo hubo una ligera disminución. Los animales tratados con PBS no mostraron disminución alguna del crecimiento tumoral. Adicionalmente los ratones tratados con MEL-1 aumentaron casi al doble la expectativa de vida en comparación a los tratados con PBS o MVA. En otros experimentos, animales portadores del mismo tumor fueron inyectados una vez con MEL-1, MVA o PBS, después de 24 horas fueron sacrificados y los tumores fijados, incluidos y cortados para inmunofluorescencia, se encontró que el tratamiento con MEL-1 indujo la formación de

cuerpos apoptóticos en extensas zonas del tumor, mientras que en los tratados con MVA o PBS fueron detectados muy pocos o ningún cuerpo apoptótico.

Estos resultados junto con las conocidas propiedades del gen E2 sugieren que en ausencia de un sistema inmune, el virus MEL-1 es capaz de producir apoptosis de las células tumorales e inclusive eliminarlo totalmente si pudiera producirse suficiente cantidad de la proteína en cada célula del tumor³⁷.

Posteriormente otro conjunto de experimentos buscó determinar la efectividad del virus en presencia de un sistema inmune competente. Fragmentos de un tumor trasplantable de conejo (VX2, contiene el genoma del papilomavirus de cola de algodón de conejos) fueron implantados intramuscularmente en conejos domésticos blancos inmunocompetentes. Después de tres semanas, los tumores fueron inyectados semanalmente durante 4 semanas con una dosis del virus MEL-1, MVA o PBS como control negativo. El tamaño de los tumores fue determinado constantemente. En las mayoría de animales tratados con MEL-1 o MVA fue medida una respuesta humoral de anticuerpos contra el virus y proteínas tumorales, sin embargo, en el caso de los inyectados con MEL-1 se pudo observar una disminución del tamaño del tumor hasta su total eliminación. Al contrario, los tumores de los grupos tratados con MVA o PBS siguieron creciendo indefinidamente y ocasionaron su muerte meses después. La expectativa de vida de los animales inyectados con MEL-1 también aumentó respecto al control MVA y fue, en general, muy parecida a la de animales que no fueron trasplantados con el tumor o inyectados en forma alguna. En experimentos adicionales se determinó que la eliminación del tumor fue mediada (al menos parcialmente) por macrófagos activados por anticuerpos contra proteínas tumorales³⁸.

En estudios clínicos la vacuna MEL-1 se administró la vacuna MEL-1 a mujeres infectadas con HPV-16, -18 o -16 y -18 además de lesiones precancerosas (NIC I y NIC II) o cáncer in situ (NIC III). El esquema de vacunación fue de 6 dosis, una cada semana de 5×10^7 ufp de MEL-1 directamente en la lesión. Como control se trató a pacientes con los mismos síntomas empleando conización para eliminar la lesión precancerosa³⁹ (la legislación mexicana prohíbe la administración de placebos a pacientes con algún grado de NIC⁴⁰). Los resultados inmediatos fueron similares en ambos tratamientos: en 87% de los casos tratados con la terapia génica MEL-1 se eliminó completamente la lesión contra 88% de los pacientes tratados con criocirugía, el resto en ambos tuvo una disminución del grado de la lesión. Sin embargo a diferencia de lo ocurrido con los pacientes sometidos a cirugía, los pacientes tratados con MEL-1 desarrollaron una respuesta inmune mediada por anticuerpos contra MEL-1 y linfocitos T citotóxicos dirigidos contra células tumorales, se determinó que ambas respuestas estaban directamente correlacionadas con la eliminación de la lesión. No se registraron efectos adversos severos en ninguno de los pacientes tratados con MEL-1, solamente un cuadro parecido a gripa o dolor pélvico moderado posterior a la segunda o tercera dosis. En el 50% de los pacientes vacunados y 37.7% de los pacientes tratados con criocirugía, no es posible encontrar ADN de VPH después del tratamiento. Adicionalmente, el tratamiento con MEL-1 genera una inmunidad protectora que evita la aparición de nuevas lesiones precancerosas, como lo demuestra el seguimiento por más de 8 años de la pacientes, en cambio los tratamiento convencionales como la criocirugía o la cotización presentan reincidencia de nuevas lesiones⁴¹. En un estudio clínico similar, ninguna de las pacientes con NIC-II o III tratadas con la vacuna MEL-1 mostraron recurrencia en el periodo de seguimiento, mientras que 15% de las pacientes tratadas mediante cotización mostraron recurrencia de NIC-III un año después del tratamiento⁴².

Materiales y métodos

Estrategia experimental

Debido a que el virus MEL-1 se diseñó para ser empleado en humanos, la determinación de su toxicidad resulta un aspecto crucial del desarrollo, la estrategia experimental adoptada es la de inocular animales inmunocompetentes con dosis muy altas del virus (de manera absoluta, la mayor dosis ocupada en este estudio fue dos veces la empleada en humanos, sin embargo considerando el peso de los ratones, ésta fue aproximadamente 4000 veces más grande que la empleada en las pacientes), lo que se espera de esta aproximación es que cualquier reacción adversa debida a la infección con el virus pueda ser exacerbada y fácilmente detectada con los medios disponibles. Uno de los parámetros más sencillos de determinar y que es rápidamente alterado cuando existe una infección es el peso corporal. En tratamientos compuestos de varias dosis es importante determinar el surgimiento de reacciones alérgicas debidas a una primera exposición al antígeno, con esto en mente, en el presente estudio se decidió aplicar una segunda dosis quince días después que la inicial, el parámetro medido en los días subsecuentes a ambas inoculaciones fue el de temperatura óptica como una medida de respuesta febril en los animales.

Como se mencionó en la introducción, en estudios precedentes se determinó la expresión de un gen reportero codificado por un virus MVA recombinante en varios órganos, solo fue posible detectar la expresión de este gen 24 pero no 48 horas después de haber sido administrado, sin embargo, para el caso de una vacuna importa más la persistencia a largo plazo, por lo que en nuestro proyecto, se realizaron cortes de diversos órganos fijados 15 días después de la segunda dosis, se procedió entonces a hacer una inmunotinción para detectar componentes de la cápside viral. Los órganos de algunos

animales fueron procesados y teñidos para determinar lisis, abscesos u otras alteraciones causadas por la infección del virus. En infecciones virales es común un aumento de los linfocitos T y B, para el análisis de los parámetros sanguíneos se realizó mediante un hemograma y una bioquímica sanguínea.

Ratones y extracción de sangre

Aunque el método de toma de muestras de sangre rara vez es mencionado en la literatura como causante de variaciones en los parámetros medidos, se ha encontrado que tiene un impacto significativo en los resultados de ensayos hematológicos⁴³, la menor variación en los parámetros ocurre cuando se extrae a través de la vena cava caudal (VC) seguido por la punción intracardiaca (IC). Los niveles de transaminasas (por ejemplo AST y ALT) presentan su mayor alteración cuando la sangre se extrae por vena retro-orbital (RO) o por toma de muestra de sangre extravasada del peritoneo (PT). Además de los parámetros hematológicos es importante la elección del sitio de extracción por los volúmenes de sangre que pueden ser obtenidos de cada uno de ellos. Además por el peso generalmente menor de las hembras es más complicado coleccionar los volúmenes necesarios en ellas. En ratones y otros mamíferos pequeños esto impone limitaciones al número y tipo de análisis que pueden efectuarse. El sexo de los animales impone alteraciones sustanciales en la mayoría de los parámetros de los hemogramas y químicas sanguíneas. Respecto a la variación provocada por el método IC, es relativamente baja en los conteos celulares, albúmina, globulinas, bilirrubina, proteínas, creatinina y mucha en la AST, ALT, fosfatasa alcalina, amilasa, aldolasa y lipasas. Este patrón se repite tanto en hembras como machos.

Producción del virus MEL-1

Huevos embrionados de pollo (*Gallus gallus*) de 11 días de incubación certificados como “Libre de patógenos específicos” fueron procesados para obtener los cultivos primarios de fibroblastos de embrión de pollo (FEP) requeridos. Los huevos fueron introducidos en un gabinete de seguridad biológica (Forma Scientific, EUA) y dispuestos con la cámara de aire hacia arriba. El cascaron se sanitizó rociándolo con etanol al 96% y se le practicó una abertura en la zona de la cámara de aire empleando unas tijeras quirúrgicas, se retiró la membrana interna y se tomó al embrión por una de las extremidades inferiores empleando unas pinzas quirúrgicas, se removieron la cabeza, las alas y las patas. El torso fue colocado en una caja petri conteniendo 15 mL de medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) estéril, se desecharon los órganos abdominales y se forzó el paso de tejido restante a través de la salida de una jeringa desechable estéril de 20 mL. El macerado obtenido fue depositado en un matraz erlenmeyer de 250 mL que contenía 4 mL de solución de tripsina 0.25% (Gibco, EUA) en 46 mL de DMEM. El macerado se incubó en esta solución a 37°C, durante 10 minutos agitando en forma orbital con la mano, se filtró a través de cuatro capas de gasa estéril para eliminar los tejidos no solubilizados y se le añadieron 2 mL de solución de tripsina 0.25%. Se volvió a incubar 10 minutos a 25°C, filtró en gasa estéril y se colocó en un tubo de centrifuga de 50 mL.

Se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos (20°C), se eliminó el sobrenadante y se le añadieron 10 mL de DMEM. Se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se le añadieron 10 mL de DMEM con 5% de SFB. Fue centrifugado y resuspendido en 5 mL de DMEM con 5% de SFB. Se colocó 1 mL de esa suspensión celular en cajas de cultivo de 75 cm² (Corning, EUA) conteniendo 10 mL de DMEM con 5% de SFB. Las cajas se incubaron a 37°C y 5% de CO₂.

Diariamente fueron observados al microscopio con contraste de fases (Carl-Zeiss, Alemania), cuando alcanzaron la confluencia (aproximadamente 72 horas de incubación) se eliminó el medio agotado por aspiración y se le añadieron 4 mL de solución de tripsina 0.25% / caja y se incubaron a 37°C durante 10 minutos. La monocapa fue desprendida con un golpe en el canto de cada caja, la suspensión celular se colocó en dos tubos de 50 mL y fue centrifugada a 2500 rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se eliminó por aspiración y se resuspendió la pastilla celular con 5 mL de DMEM con 5% de SFB por cada caja original. Se colocó 1 mL de esta suspensión en cajas de 75 cm² conteniendo 10 mL de DMEM con 5% de SFB. Las cajas fueron incubadas a 37°C y 5% de CO₂.

Una vez que estos cultivos tuvieron una confluencia del 90%, les fue retirado el medio agotado por aspiración y se les añadieron 4 mL de DMEM con 2.5% de SFB. A cada caja se le adicionó el volumen de una suspensión viral de MEL-1 caracterizado en PBS necesario para obtener una multiplicidad de infección (mdi) de 0.1. Las cajas se incubaron durante 60 minutos en las condiciones arriba señaladas, se eliminó el medio agotado y se colocaron 10 mL / caja de medio de selección (DMEM con 5% de SFB, 3.3% de solución de xantina en agua, 0.33% de solución de hipoxantina en agua y 0.33% de solución de ácido micofenólico en agua). Fueron incubadas en las mismas condiciones. Los cultivos fueron observados diariamente al microscopio para determinar la presencia, forma y tamaño de las placas morfológicas del virus MEL-1 y con ello precisar el momento apropiado de la cosecha (por lo general 72 horas después de iniciada la infección).

Debido a la naturaleza mayoritariamente intracelular del virus MEL-1 es necesario romper las células para purificar el virus, por lo que para cosechar los cultivos se procedió de la siguiente manera. Se desprendieron la totalidad de las monocapas infectadas empleando raspadores celulares, las células fueron entonces concentradas por centrifugación en

tubos cónicos para centrifuga de 50 mL a 2500 rpm durante 5 minutos y dejadas en 10 mL medio DMEM, con 5% de SFB, este centrifugado toma el nombre de extracto crudo. Los tubos se almacenaron a -20°C hasta su purificación.

Para purificar el virus se descongelaron 10 o 15 tubos con extracto crudo, el contenido de los cuales se junto en un tubo de centrifuga de 50 mL y se centrifugaron a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C. Pasado este tiempo, el sobrenadante fue eliminado por aspiración y la pastilla celular fue resuspendida en 30 mL / tubo de TRIS HCl 1mM pH 9.0. se agita en vortex a máxima potencia durante 60 segundos. Se colocó el resuspendido en un homogenizador Dounce de 100 mL (4°C). Se homogenizó haciendo subir y bajar el émbolo 40 veces. Se colocó el homogenizado en tubo de centrifuga de 50 mL y se agitó en vortex a máxima velocidad. Se centrifugó a 2500 rpm durante 10 minutos a 4°C, el sobrenadante fue colocado en otro tubo de 50 mL y se le añadieron 7 mL de TRIS HCl, se agitó en vortex durante 1 minuto y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El sobrenadante de esta centrifugación se juntó con el anterior. El sobrenadante se dividió en 2 tubos de centrifuga de 15 mL. Fueron sonicados durante 1 minuto a 200W.

Se colocaron 18 mL de solución estéril de sacarosa al 36% en agua en dos tubos de ultracentrífuga (Beckman Coulter, EUA) previamente esterilizados por 30 minutos con solución 0.5 M de NaOH y lavados 10 veces con agua desionizada. La suspensión viral sonicada se colocó vertiendo lentamente sobre los colchones de sacarosa. El peso de los tubos se niveló con amortiguador de TRIS HCl.

Fueron centrifugados a 13500 rpm durante 80 minutos en una ultracentrífuga preparativa (Beckman Coulter, EUA), se eliminó el sobrenadante por aspiración y se resuspendió cada pastilla en 4 mL de PBS estéril (K=44mM, Na=1571mM, Cl=1396 mM, P=119 mM, pH 7.2). Se mezclaron ambas suspensiones virales, se colocaron en un tubo cónico de

centrífuga de 15 mL y se agitaron a aproximadamente 200 rpm en un vortex. Finalmente el tubo fue sonificado durante 1 minuto a 200W. Fue almacenado a -20°C hasta su uso.

Titulación

El título viral de la suspensión purificada fue determinado de la siguiente manera: se obtuvo una caja confluyente con FEP empleando el protocolo descrito arriba. Cuando la monocapa alcanzó la confluencia se resembró en cajas de cultivo de 6 pozos en una proporción de 1:4. Cuando los pozos llegaron al 90% de confluencia se sustituyó el medio agotado por 0.7 mL de DMEM con 2.5% de SFB.

se colocaron 10 µL de la suspensión viral problema en el pozo 1 de la caja, se mezcló cuidadosamente empleando una micropipeta de 200 µL e inmediatamente se tomaron 7 µL del pozo 1 y se colocaron en el pozo 2 (dilución 10^{-2}) el cual se mezcló como se menciono previamente. Se continuó de la misma manera hasta llegar al pozo 5 (dilución 10^{-8}), el pozo 6 fue dejado sin infectar como control negativo. Cada titulación se realizó por duplicado. Las cajas de cultivo fueron entonces incubadas durante 60 minutos a 37°C y 5% de CO₂. Después de este tiempo se eliminó el medio de infección y se colocaron 2 mL / pozo del medio de selección (DMEM con 5% de SFB, 1 mL de solución de xantina en solución 0.1 de NaOH (10 mg / mL), 0.1 mL de solución de hipoxantina en agua dsionizada (10 mg / mL) y 0.1 mL de solución de ácido micofenólico en solución 0.1N de NaOH (10 mg / mL). Los cultivos se incubaron en las mismas condiciones durante 40 horas.

Después de la incubación se fijaron los cultivos durante 2.5 minutos colocando 1 mL / pozo de una solución 50% de metanol en acetona. Los residuos de fijador fueron lavados

4 veces empleando 2 mL / pozo de PBS en agitador orbital (aproximadamente 110 rpm). A cada pozo se le adicionó 1 mL de solución que contenía 1 µL de suero policlonal de conejo contra MEL-1 en 1 mL de PBS y se incubó durante 16 horas a 4°C en agitador orbital (aproximadamente 80 rpm), pasado este tiempo se eliminaron los residuos de solución de anticuerpos lavando 4 veces con 2 mL / pozo de PBS. A cada pozo se le colocó 1 mL de una solución compuesta por 1 µl de solución de proteína A de *Staphylococcus aureus* (Sigma-Aldrich) en 1 mL de PBS y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos. Después, se lavaron 4 veces con 2 mL / pozo de PBS. Finalmente se preparó una solución que contenía 2 µL de solución de peróxido de hidrógeno 30% y 200 µL de solución de cromógeno (10 mg / mL de o-dianisidino en metanol absoluto) en 0.98 mL de PBS y se colocaron 0.5 mL/pozo. Se espero a que se desarrollara el color (aproximadamente 20 minutos) y las placas fueron contadas en un microscopio óptico (Carl Zeiss) en campo claro. Con las cuentas de ambas repeticiones se calculó el título viral de la suspensión problema de acuerdo a:

$$T_v = \frac{50 \times (C_1 + C_2)}{D}$$

Donde:

- T_v Título viral (en viriones / mL)
- 50 Coeficiente para convertir a viriones / mL
- C_1 Número de placas contadas en pozo de caja A
- C_2 Número de placas contadas en pozo de caja B
- D Dilución del pozo en el que se realizó el conteo

Ratones

Los ratones de ambos sexos (*Mus musculus*) empleados en todos los experimentos pertenecían a la cepa Balb/c (Harlan, México) y tenían entre 9-11 semanas de edad. Los animales fueron certificados como “Libres de patógenos específicos” por el proveedor. Fueron colocados aleatoriamente de 3 a 5 animales de cada sexo en cajas de 600 cm² de área de piso con aserrín para material de cama (previamente esterilizadas con vapor caliente) y conectadas a un aislador biológico (MARCA?). Los animales fueron alimentados *ad libitum* con comprimidos balanceados estériles (Harlan, México) y tuvieron acceso ilimitado a agua desionizada estéril. La jaula, el material de cama, el alimento y el agua fueron reemplazados cada 4 días en promedio. La temperatura media del aire durante el experimento fue de 22°C y el fotoperiodo fue de 12 horas aproximadamente. Los animales fueron mantenidos de acuerdo a las buenas prácticas de cuidado de animales de laboratorio⁴⁴.

Alteraciones clínicas, hemograma, bioquímica e histopatología de ratones inoculados con tres dosis del virus MEL-1

El día 0 del experimento fueron inyectados (empleando jeringas de insulina de 1 mL estériles) grupos de ratones Balb/c macho (n=5) de 11 semanas de edad con 10⁶, 10⁷ o 10⁸ ufp del virus MEL-1 o PBS como control negativo (aproximadamente entre 200 µL de volumen). El día 15 del experimento cada grupo se volvió a inyectar con la misma cantidad del virus o PBS. Ambas inyecciones se realizaron por vía subcutánea atrás de la

oreja derecha. El mismo esquema fue empleado para inyectar grupos de ratones Balb/c hembra (n=5) de la misma edad.

Fue registrada cualquier alteración conductual o clínica observada en el curso del experimento. Adicionalmente el sitio de la inyección fue revisado después de cada inoculación del virus y en forma periódica durante el resto del experimento (ver apartado correspondiente).

El peso de los animales fue registrado empleando una balanza granataria (Sartorius, EUA) cada 24 horas durante una semana después de cada inyección y cada 48 horas durante el resto del experimento. La temperatura ótica de los ratones también fue registrada empleando un termómetro de infrarrojos (Bayer, EUA) los días 1, 3, 15, 16, 17 y 25 del experimento. El consumo de alimento diario per cápita fue determinado dividiendo el número de comprimidos consumidos durante el experimento entre el número de animales en la jaula y los días de duración.

El día 30 del experimento los animales fueron anestesiados intraperitonealmente con una mezcla de 30 μ L de ketamina y 15 μ L de gilacina. Se les tomó una muestra de sangre para realización de hemograma (ver apartado correspondiente) y a otros una muestra de suero para realización de una bioquímica sanguínea (ver apartado correspondiente). A todos se les practicó una necropsia (ver apartado correspondiente). La mayoría de sus órganos fueron pesados y una muestra de ellos fue procesada para realizar histopatología (ver apartado).

Para poder comparar los resultados entre ratones de diferente peso o entre sexos, los datos de peso al día n fueron transformados a porcentaje de variación respecto al peso del ratón al día 0 del experimento empleando la siguiente ecuación:

$$V_p = \frac{P_0}{P_n} \times 100$$

Donde:

V_p Variación de peso

P_0 Peso inicial

P_n Peso al día n

100 Coeficiente para convertir a porcentaje

Esta transformación fue usada en un estudio en el que se comparaba la protección de una vacuna contra viruela en ratones en ratones con deficiencias inmunes (referencia???)

Los datos de peso fueron analizados empleando una prueba t de Student suponiendo varianzas iguales (dos colas, $\alpha=0.05$).

Los datos de temperatura fueron analizados empleando el estadístico t de Student para determinar diferencias significativas entre los tratamientos y controles suponiendo varianzas iguales (dos colas, $\alpha=0.05$).

Reacciones en el sitio de la inoculación

Se determinó la presencia de reacciones locales en el sitio de la inyección del virus. El método empleado fue por palpación (con pulgar e índice) del pliegue cutáneo atrás de la oreja derecha. En caso de duda, se comparó la piel del sitio de inyección con la de otras partes del dorso.

Necropsias

Inmediatamente después de obtener las muestras de sangre, los animales fueron sometidos a necropsia por un patólogo veterinario calificado (Jefe del Bioterio, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM), en esta se revisaron visualmente todos los órganos y sistemas principales (exceptuando cerebro).

Hemograma

Al día 30 del experimento fueron seleccionados dos ratones del tratamiento 10^8 ufp de MEL-1 y dos ratones control, ambos especímenes fueron machos. A cada animal se le extrajo una muestra de sangre periférica por punción cardíaca del ventrículo izquierdo (aproximadamente 0.7-0.9 mL / ratón) empleando una jeringa de 3 mL previamente cargada con 50 μ L de EDTA 0.5 M. Las muestras se transfirieron a tubos para microcentrífuga de 2 mL, almacenadas durante 1 hora a 4°C y analizadas por personal calificado en el departamento de Patología (Sección Patología Clínica) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM para la realización de un hemograma. Los parámetros analizados fueron: hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, VGM, CGMH, meticulocitos, plaquetas, proteínas totales, fibrinógeno, leucocitos, neutrofilos, bandas, metamielocitos, mielocitos, linfocitos, monolitos, eosinófilos, basófilos y morfología de eritrocitos.

Bioquímica sanguínea

Al día 30 del experimento fueron seleccionados cuatro ratones macho, dos de ellos del tratamiento 10^8 ufp de MEL-1 y dos del control. A cada animal se le extrajeron de 0.7 a 0.9

mL de sangre periférica por punción cardiaca del ventrículo izquierdo empleando una jeringa de 3 mL sin anticoagulante. Las muestras se transfirieron a tubos para microcentrífuga de 2 mL, y se almacenaron durante 12 horas a 4°C. Después de este periodo el suero de las muestra se colectó por centrifugación a 3000 rpm y se almacenó a 4°C. Las muestras fueron analizadas por personal calificado en el departamento de Patología (Sección Patología Clínica) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM para la realización de una bioquímica clínica. Los parámetros analizados fueron: glucosa, urea, creatinina, colesterol, billirrubina total. Billirrubina conjugada, billirrubina no conjugada, alaninamino transferasa (ALT), aspartatoamino transferasa (AST), fosfatasa alcalina, gamaglutamil transferasa, creatín quinasa, proteínas totales, albúmina, globulinas, relación A/G, calcio, fósforo, relación Ca/P, potasio, sodio, cloro, bicarbonato, anión gap, diferencia de iones fuertes, osmolaridad y triglicéridos.

Histopatología

Inmediatamente después de la necropsia, los siguientes órganos fueron removidos quirúrgicamente: intestino delgado, intestino grueso, glándulas adrenales, estómago, hígado, glándulas salivales, vesícula seminal, testículos, epidídimo, bazo, pulmones, timo, páncreas, riñones ovarios, útero (incluido cervix) y piel. Cada uno de estos órganos fue fijado con 5 mL de formaldehído al 10% en agua desionizada estéril durante 24 horas y dejado en 8 mL de formaldehído al 10% en agua desionizada estéril hasta su procesamiento.

El procesamiento para corte y teñido fue como sigue: los órganos fueron deshidratados por inmersión en soluciones seriales de etanol en agua (10, 30, 40, 60, 90% y absoluto), e incluidos en parafina. Cortes semifinos (10 μ m de grosor) fueron obtenidos empleando un

microtomo (Leica, EUA) y fueron teñidos con hematoxilina / eosina. Las secciones se montaron en portaobjetos con resina sintética Accuo Mount (Baxter Healthcare, EUA).

Las laminillas fueron observadas, interpretadas y comparadas con los controles buscando alteraciones en la estructura microscópica de los tejidos por dos patólogos clínicos independientes. Ninguno de ellos tenía conocimiento del tratamiento experimental a que fue sometido el ratón portador del órgano cuyo corte analizaba.

Inmunohistoquímica de ratones inoculados subcutáneamente con el virus MEL-1

Ratones Balb/c de 9 semanas de edad fueron inoculados con 10^8 ufp del virus MEL-1 (n=5) o PBS (n=5) en la forma descrita en la sección “Hemograma, bioquímica e histopatología de ratones inoculados con tres dosis del virus MEL-1”. Al día 30, los animales fueron anestesiados y sometidos a necropsia. Una muestra de la mayoría de los órganos (la misma lista de órganos que los destinados a histopatología) fue procesada para realizar una inmunohistoquímica (ver apartado correspondiente).

Adicionalmente un ratón macho de la misma cepa fue inoculado por vía intranasal con 10^8 ufp del virus vaccinia WR (provisto por el Dr. Ricardo Rosales; 25 μ L de la suspensión viral en PBS, aproximadamente la mitad fue puesta al interior de cada fosa nasal empleando la punta estéril de una micropipeta de 20 μ L). Ocho días después de la infección, fue anestesiado con una mezcla de 30 μ L de ketamina y 15 μ L de gilacina. Se le practicó una necropsia siguiendo el procedimiento descrito arriba.

Los órganos fueron aislados quirúrgicamente y lavados con 10 mL de PBS valiéndose de su propio sistema vascular (se utilizó una jeringa hipodérmica estéril de 10 mL), posteriormente fueron fijados con 8 mL de paraformaldehído (PF) 4% en PBS, una

sección de cada órgano fue colocada en un tubo de centrifuga estéril de 15 mL que contenía 7.5 mL de solución 4% de PF durante 30 minutos a temperatura ambiente, se eliminó el fijador y se colocaron 2 mL de solución de sacarosa 15% en PBS, fue mantenido en estas condiciones a 4 °C durante 24 horas, se sustituyó el medio por solución de sacarosa 30% en PBS, la que fue mantenida durante 24 horas a 4 °C. Al terminar este periodo, la muestra se retira del medio y se seca con papel filtro, se coloca en un pozo de polietileno que es llenado con medio para congelación (Tissue-Tek), se coloca sobre hielo seco hasta su solidificación y se mantiene a -70 °C hasta su corte.

Cortes semifinos (10 µm de grosor) fueron obtenidos empleando un microtomo para congelación y pegados a portaobjetos de vidrio.

La inmunohistoquímica de los cortes se realizó empleando el siguiente procedimiento (protocolo modificado de Vectastain, Vector, EUA). Los cortes fueron fijados colocándoles una gota de paraformaldehído 4% en PBS a temperatura ambiente durante 20 minutos, se lavaron por goteo con PBS y se dejaron en el amortiguador durante 5 minutos, los epitopos del anticuerpos primario fueron expuestos colocando una gota de solución de ácido cítrico 0.1 M en agua desionizada (pH 6.0) sobre el corte e incubando 2 minutos en microondas a toda potencia, se lavaron con PBS y fueron incubados durante 30 minutos a temperatura ambiente en suero de caballo (Gibco, EUA) 1:100 en PBS, se lavaron con PBS por goteo y fueron incubados en solución 1:50 en PBS (con 0.1% de albúmina de suero de bovino) de anticuerpo policlonal de conejo contra vaccinia (al cual previamente se le habían eliminado los anticuerpos inespecíficos) durante 40 minutos a temperatura ambiente, los cortes fueron lavados con PBS e incubados en anticuerpo monoclonal (contra conejo) 1:200 en PBS (con 0.1% de albúmina de suero de bovino) durante 60 minutos a temperatura ambiente, se lavo con PBS en tres ocasiones y se incubó en una

gota del solución de cromógeno (1 mg / mL de diaminobenzidina, 4 μ L de solución de peróxido de hidrógeno 30% / mL, en PBS) 1-2 minutos (dependiendo del desarrollo de la reacción) a 4 °C, se lavó con PBS y los cortes fueron contrateñidos con hematoxilina 0.5%, fueron lavados con agua corriente y después con agua destilada. Los cortes ya teñidos fueron deshidratados durante 4 minutos a temperatura ambiente en soluciones progresivamente mas concentradas de etanol en agua (70, 80 y 100%), posteriormente se colocó una gota de xileno 1:1 en etanol absoluto y después una gota de xileno puro por 4 minutos. Se montó con histomount, y el perímetro del cubreobjetos fue sellado con barniz de uñas.

Los cortes fueron observados en campo claro en un microscopio óptico (Carl Zeiss, Alemania) y fotografiados empleando una cámara digital (Cannon, EUA) a una resolución de 1024 x 768 pixels.

Objetivos

General

Determinar reacciones adversas presentadas por ratones Balb/c causadas por la inoculación subcutánea del virus MEL-1.

Específico

Determinar alteraciones en el peso de ratones Balb/c de ambos sexos inoculados con tres dosis del virus MEL-1.

Determinar alteraciones en la temperatura de ratones Balb/c de ambos sexos inoculados con tres dosis del virus MEL-1.

Determinar alteraciones en el consumo de alimento de ratones Balb/c de ambos sexos inoculados con tres dosis del virus MEL-1.

Determinar alteraciones en parámetros hematológicos y bioquímicos de ratones Balb/c de ambos sexos inoculados con tres dosis del virus MEL-1.

Determinar la presencia de componentes virales en los órganos de ratones Balb/c de ambos sexos inoculados con tres dosis de MEL-1.

Hipótesis

Se ha demostrado que el virus MEL-1 es incapaz de multiplicarse en células de mamífero, además al ser inoculado en ratones atímicos portadores de un tumor humano no provocó reacciones adversas, el mismo resultado fue obtenido en conejos portadores de un tumor trasplantable. Aunado a estas observaciones, el vector empleado para construir MEL-1, MVA, ha sido extensivamente estudiado en pruebas con animales y humanos, habiéndose demostrado la casi total ausencia de reacciones adversas en estos modelos.

Por estos antecedentes se cree que no se presentarán reacciones adversas al ser inoculado MEL-1 en ratones inmunocompetentes aún en dosis altas.

Resultados

Producción del virus MEL-1 empleado en los experimentos.

Se produjeron aproximadamente 6×10^9 ufp del virus MEL-1 en un total de 17 lotes de FEP a partir de una semilla viral provista y caracterizada por el Dr. Ricardo Rosales Ledezma. Esa cantidad de virus fue purificado en dos corridas por ultracentrifugación en colchón de sacarosa y mantenido continuamente a -20° . El título viral fue calculado infectando cultivos de FEP con diluciones progresivamente mayores del virus.

Alteraciones en el peso y temperatura de ratones Balb/c inoculados con tres dosis del virus MEL-1.

Grupos de ratones Balb/c fueron inoculados subcutáneamente con tres diferentes dosis del virus MEL-1 o PBS como control negativo. Cada animal fue pesado varias veces durante el experimento y se determinó la alteración del peso en un día dado respecto al peso inicial (Figura 1). Los datos fueron analizados mediante una prueba *t* de Student para determinar diferencias significativas entre cada grupo experimental y el control negativo para cada uno de los días.

El análisis de la variación de peso de los ratones machos no mostró diferencias significativas entre ninguno de los tratamientos y el control.

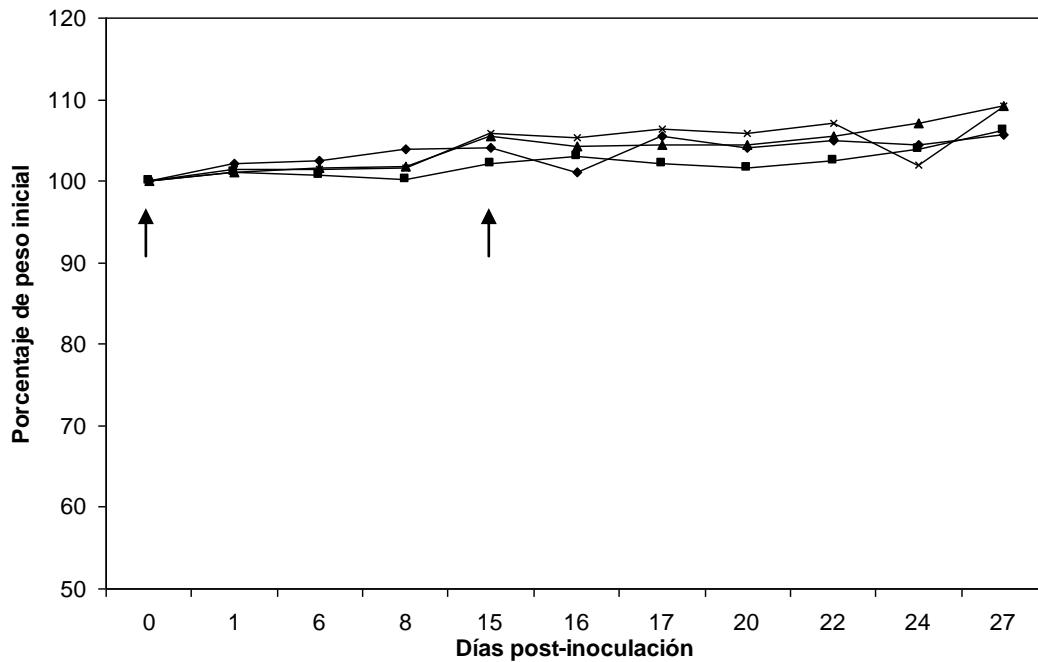


Figura 1. Peso de ratones macho inoculados con MEL-1. Grupos de ratones fueron inoculados dos veces separadas por 15 días con 10^6 (■), 10^7 (▲) o 10^8 (×) ufp de MEL-1 o PBS (◆). Se muestra el promedio de la variación de peso de cada tratamiento posterior a la primera inoculación. Las flechas indican los días de inoculación.

En el caso de los grupos de hembras tratadas (Figura 2), se determinó un aumento significativo entre el tratamiento MEL-1 10^8 ufp y el control, pero no entre el control y los tratamientos con 10^6 o 10^7 ufp del virus.

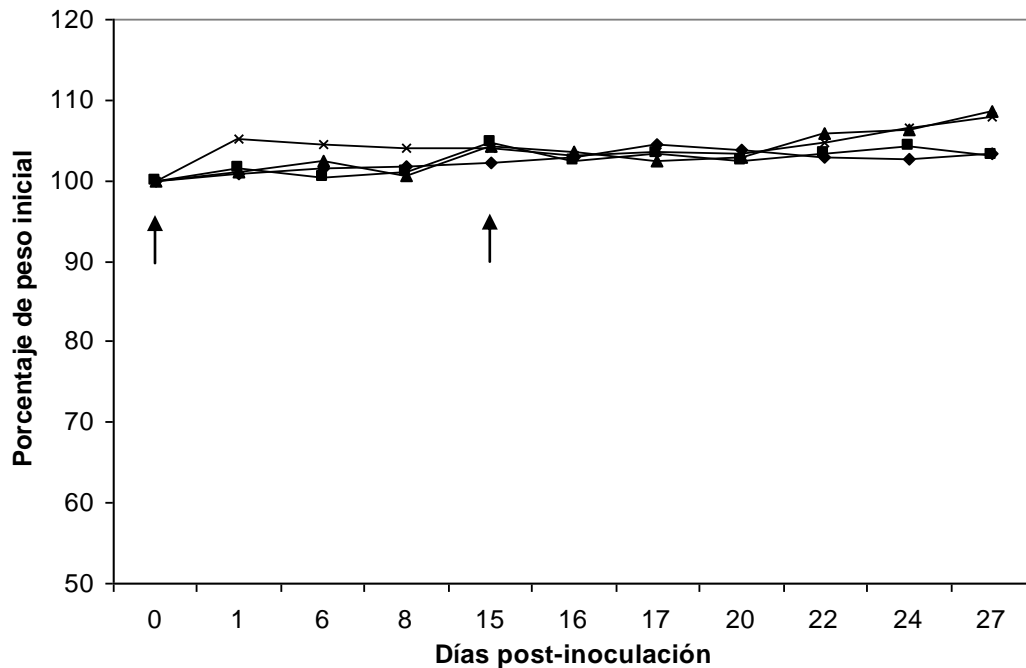


Figura 2. Peso de ratones hembra inoculados con MEL-1. Grupos de ratones fueron inoculados dos veces separadas por 15 días con 10^6 (■), 10^7 (▲) o 10^8 (×) ufp de MEL-1 o PBS (◆). Se muestra el promedio de la variación de peso de cada tratamiento posterior a la primera inoculación. Las flechas indican los días de inoculación.

El consumo de alimento fue determinado contando la cantidad de comprimidos de alimento que los ratones de cada caja comieron en el tiempo que duró el experimento y dividiendo esta cantidad por el número de ratones en la caja. Debido a que solo se cuenta con dos promedios de consumo por tratamiento (uno de cada caja), no fue posible aplicar una prueba estadística para determinar si las diferentes dosis de MEL-1 provocaron ayuno o sobrealimentación en los animales. Los datos de consumo se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Consumo de alimento. Se muestra el promedio de consumo de alimento de cada tratamiento. Los datos representan el promedio por cada ratón en un día.

Sexo	Tratamiento	Consumo (comprimidos / ratón día)
Hembra	Control (PBS)	0.54 ± 0.08
	10 ⁶ ufp de MEL-1	0.48 ± 0.02
	10 ⁷ ufp de MEL-1	0.60 ± 0.05
	10 ⁸ ufp de MEL-1	0.47 ± 0.1
Macho	Control (PBS)	0.85 ± 0.14
	10 ⁶ ufp de MEL-1	0.57
	10 ⁷ ufp de MEL-1	0.61 ± 0.035
	10 ⁸ ufp de MEL-1	0.47 ± 0.08

La temperatura de los animales fue estimada empleando un termómetro de infrarrojos durante 10 segundos directa en la oreja izquierda. Este parámetro fue medido en los días siguientes a la primera inoculación (1 y 3) y en los posteriores a la segunda (15, 16, 17 y 25).

Se empleó la prueba de t para detectar posibles diferencias entre los tratamientos. La temperatura de los ratones macho tratados con alguna dosis del virus no fue significativamente diferente a la de los ratones control (Figura 3).

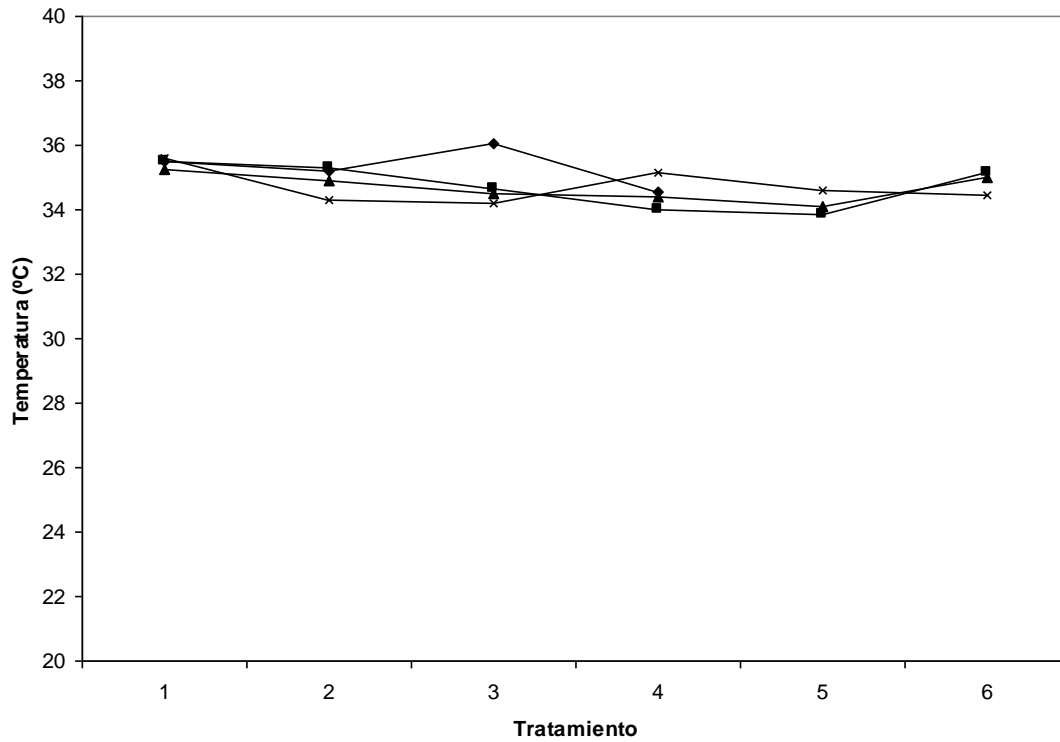


Figura 3. Temperatura de ratones macho inoculados con MEL-1. Grupos de ratones fueron inoculados dos veces separados por 15 días con 10^6 (■), 10^7 (▲) o 10^8 (×) ufp de MEL-1 o PBS (◆). Se muestra la temperatura promedio de cada tratamiento en los días medidos .

Como en el caso de los ratones macho, ninguno de los datos de temperatura de los ratones hembra inyectados con MEL-1 presentó diferencias significativas con los del grupo control, indistintamente de la dosis empleada.

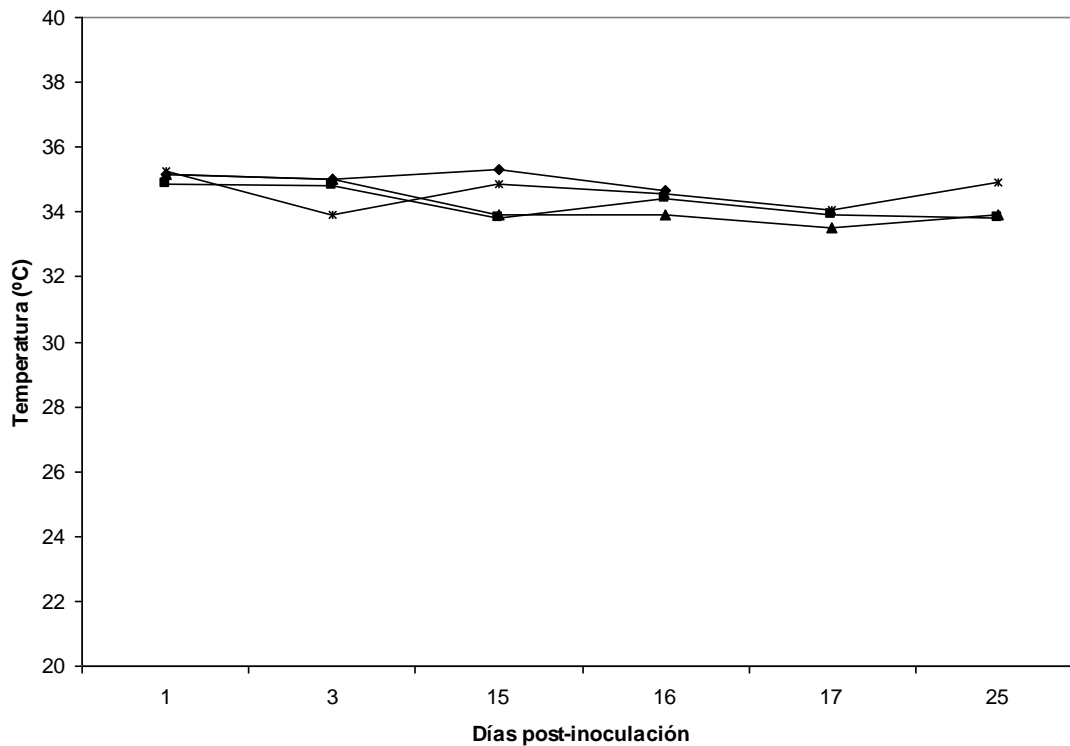


Figura 4. Temperatura de ratones hembra inoculados con MEL-1. Grupos de ratones fueron inoculados dos veces separadas por 15 días con 10^6 (■), 10^7 (▲) o 10^8 (×) ufp de MEL-1 o PBS (◆). Se muestra la temperatura promedio de cada tratamiento en los días medidos.

Alteraciones en parámetros hematológicos de ratones inoculados con MEL-1.

Al finalizar el experimento, cuatro ratones macho (dos correspondientes al tratamiento con 10^8 ufp de MEL-1 y dos controles (PBS)) fueron anestesiados y se les extrajo una muestra de sangre (con anticoagulante) por punción cardiaca. Se realizó un hemograma a cada una de esas muestras. La tabla 2 muestra los resultados obtenidos. La única variación fue

un aumento ligeramente superior al rango en los linfocitos de uno de los ratones inoculados con MEL-1.

Tabla 2. Hemograma de ratones inoculados con MEL-1. Se muestran los hemogramas practicados a dos ratones control y dos ratones tratados con la dosis más alta del virus.

Analito	Referencia	Ratón 1 Control (PBS)	Ratón 2 Control (PBS)	Ratón 8 MEL-1 10⁸	Ratón 7 MEL-1 10⁸	Unidades
Hematocrito	0.38-0.44	0.38	0.25	0.38	0.35	L / L
Hemoglobina		ND	ND	ND	ND	g / L
Eritrocitos	7.8-9.1	8.5	5.5	8.4	7.1	x 10 ¹² / L
VGM	45-53	45	45	45	49	FL
CGMH		ND	ND	ND	ND	g / L
Reticulocitos	3.7-10.7	n/m	n/m	n/m	284	x 10 ⁹ / L
Plaquetas	102-297	600	Cúmulos	120	Cúmulos	x 10 ⁹ / L
Proteínas totales	44-66	55	54	54	50	g / L
Fibrinógeno	0.9-2.5	2	1	4	1	g / L
Leucocitos	4.5-10.5	7.3	1.7	4.9	10.2	x 10 ⁹ / L
<i>Diferencial</i>						
Neutrófilos	0.5-2.5	1.5	0.4	1.7	1.6	x 10 ⁹ / L
Bandas	0.2-0.63	0	0	0	0	x 10 ⁹ / L
Metamielocitos		0	0	0	0	x 10 ⁹ / L
Mielocitos		0	0	0	0	x 10 ⁹ / L
Linfocitos	3.4-8.2	5.6	1.2	3.1	8.7	x 10 ⁹ / L
Monocitos	0.1-2.3	0	0.1	0.1	0	x 10 ⁹ / L
Eosinófilos	0-1.6	0.2	0	0	0	x 10 ⁹ / L
Basófilos	0-0.08	0	0	0	0	x 10 ⁹ / L

Otros cuatro ratones fueron destinados a la realización de una bioquímica sanguínea. Dos controles (PBS) y dos ratones del grupo 10⁸ ufp de MEL-1. Al día 30 del experimento fueron anestesiados y se les extrajo una muestra de sangre por punción cardiaca (sin anticoagulante), se dejó coagular y se obtuvo el suero de las muestras por centrifugación, sin embargo, los requerimientos de la técnica empleada para realizar la bioquímica requerían un volumen mayor del obtenido para cualquier ratón en particular, por lo cual

fue necesario mezclar el suero de los dos ratones de cada tratamiento para poder realizar la prueba (Tabla 3). Los resultados entre los dos tratamientos muestran casi valores muy similares, a excepción de la creatinina que muestra un incremento del 41% y de un 58% en la cantidad de la enzima alaninamino transferasa (ALT) de los ratones tratados con 10^8 respecto a los controles, lo cual podría sugerir daño hepático, sin embargo, la muestra de los ratones 10^8 presentó un coágulo, artefacto que provoca en particular un incremento de la ALT.

Tabla 3. Bioquímica sanguínea de ratones inoculados con MEL-1. Se muestra los resultados de la prueba realizada al suero de ratones control (PBS) e inoculados con 10^8 ufp de MEL-1. El suero empleado fue la mezcla de los sueros de dos ratones con el mismo tratamiento.

Analito	Ratones 13 y	Ratones 9 y	Unidades
	14 Control (PBS)	10 MEL-1 10^8	
Glucosa	14	14	mmol/L
Urea	6.6	9.2	mmol/L
Creatinina	22	31	mmol/L
Colesterol	3.62	3.56	mmol/L
Alaninamino transferasa (ALT)	39	62	U/L
Fosfatasa alcalina (FA)	48	47	U/L
Proteínas totales	48	48	g/L
Albumina	22	23	g/L
Globulinas	26	25	g/L
Relación A/G	0.84	0.92	
Calcio	2.16	2.12	mmol/L
Fósforo	2.7	2.54	mmol/L
Relación Ca/P	0.8	0.83	
Potasio	6.99	7.19	mmol/L
Sodio	144	142	mmol/L
Cloro	116	116	mmol/L
Bicarbonato	13	11	mmol/L
Anión gap	22	22	mmol/L
Diferencia de iones fuertes	28	26	mmol/L

Osmolalidad	297	296 mOsm/L
-------------	-----	------------

Reacciones en el sitio de inoculación y resultado de necropsias

Cada 72 horas durante todo el experimento se revisó el sitio de la inyección en los animales y cada 24 en los tres días siguientes a cada inoculación. Inmediatamente después de la primera y segunda inoculaciones, el sitio de inyección (el pliegue cutáneo atrás de la oreja derecha) aparecía abultado y turgente por el volumen de líquido introducido, sin embargo después de aproximadamente 4 horas, este abultamiento desapareció. Adicionalmente se presentó un ligero enrojecimiento del sitio de inyección en los 10 minutos posteriores a ambas inoculaciones en animales de todos los grupos incluidos el control, el cual persistió por 24 horas. El resto del tiempo que duró el experimento la piel del sitio de inyección no podía ser diferenciada del resto de la piel del dorso de los animales en color y textura.

Ninguno de los animales tratados con cualquier dosis del virus MEL-1 desarrollo abscesos en el sitio de inyección, pérdida de pelo o cualquier otra alteración externa visible que pudiera ser atribuible a la acción del virus. Ninguno de los animales murió durante el curso del experimento.

Al día 30 del experimento los animales fueron anestesiados, sangrados y se les practicó una necropsia. Esta mostró que ninguno de los animales tratados con cualquiera de las tres dosis del virus MEL-1 presentaba alteraciones visibles en cualquiera de los órganos revisados.

La revisión de los cortes histológicos (histopatología) no detectó alteraciones en ninguno de los órganos analizados de cualquiera de los tres tratamientos.

En contraste con estos resultados, el animal infectado intranasalmente con 10^8 ufp del virus vaccinia de la cepa Western Reserve (WR) presentó serías alteraciones: aletargamiento a los 3 días de inoculado, pelo erizado en cabeza y tercio anterior del dorso (día 6 post inoculación) e infección indeterminada en el ojo izquierdo (día 7 post inoculación). Adicionalmente mostró una pérdida del 19.3% de su peso corporal inicial (día 7 post inoculación). El animal fue sacrificado al día 8 post inoculación para realizar una necropsia y obtener muestras de tejido para realizar una inmunohistoquímica, en este punto no era claro si el animal podría resolver la infección. La necropsia mostró abscesos en ambos pulmones.




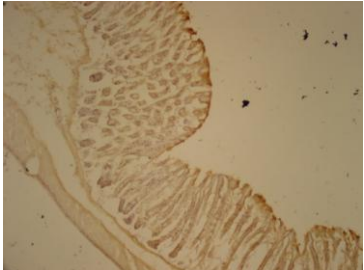
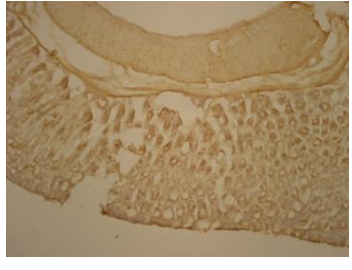

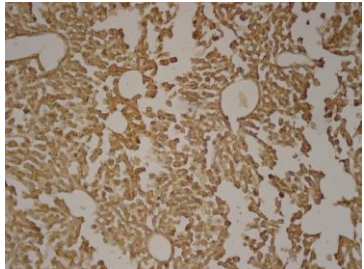
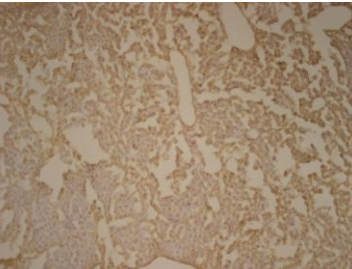
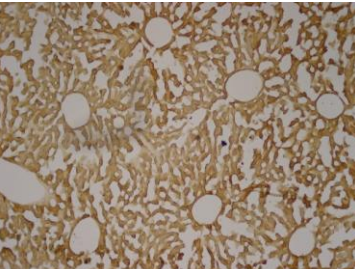
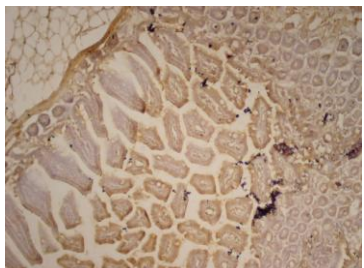
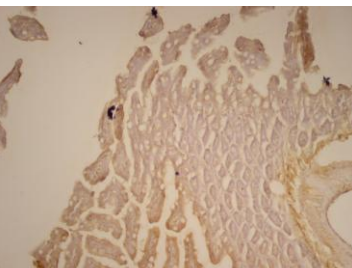
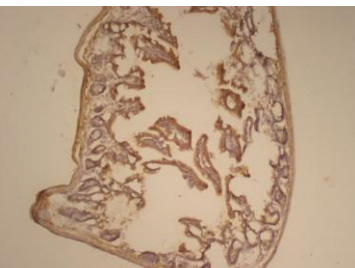
En otra serie de experimentos (no mostrados) grupos de ratones Balb/c fueron inoculados intranasalmente con una dosis letal (4×10^8 ufp / ratón) de la cepa WR, después de 3 días, los ratones estaban aletargados y con el pelo erizado, al 4to día post infección varios animales presentaban lesiones en el dorso de la cola, empeine y palma de las patas traseras e infecciones (cuyo agente etiológico no fue determinado) en uno o ambos ojos. Otros perdieron el pelo en extensas zonas de vientre y cabeza. El 50% de los animales murió 5 días después de la inoculación, presumiblemente por complicaciones debidas a la infección.

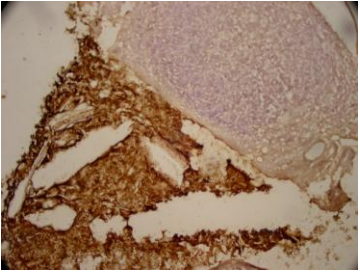
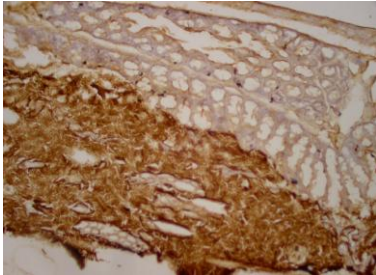
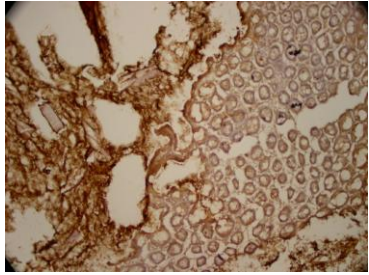
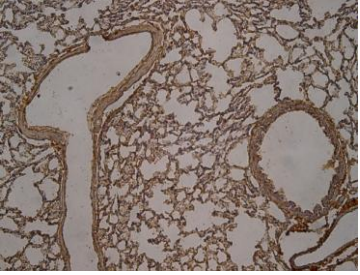
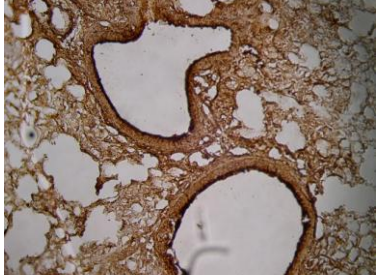
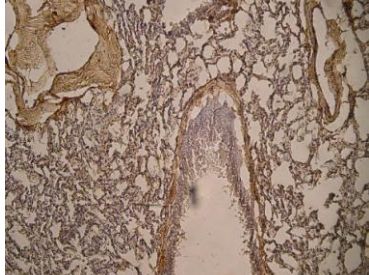
Inmunohistoquímica de ratones inoculados con MEL-1

Se obtuvieron muestras de tejido de ratones inoculados subcutáneamente con 10^8 ufp de MEL-1 o PBS. Adicionalmente, con el propósito de tener un control positivo para realizar

una adecuada comparación, se obtuvieron muestras de tejido de un ratón inoculado por vía intranasal con una dosis infectiva del virus WR (competente para replicarse en células de mamífero). Todas las muestras fueron fijadas, cortadas y teñidas para visualizar los epítomos virales presentes (Tabla 4). Ninguno de los cortes de corazón, estómago, hígado e intestino delgado muestran una detección positiva de antígenos virales, en cualquiera de los tres tratamientos. En el caso del intestino grueso, la zona que aparece fuertemente coloreada corresponde al contenido del mismo (alimento), con el que al parecer uno o mas componentes de la inmunohistoquímica presentan una reacción inespecífica, los tejidos, en cambio se muestran claramente negativos en los tres tratamientos. En el caso del pulmón, los cortes de los tratamientos 10^8 ufp de MEL-1 y control con PBS son negativos a la detección del virus, sin embargo, la capa celular que recubre los bronquiolos del corte del control positivo (WR intranasal) presenta una clara señal positiva.

Tabla 4. Inmunohistoquímica de ratones inoculados con MEL-1. Los cortes fueron teñidos empleando un anticuerpo policlonal contra vaccina como primario, seguido de un anticuerpo monoclonal acoplado a peroxidasa contra el primario y revelando con un cromógeno insoluble.

	10 ⁸ ufp MEL-1 subcutáneo	10 ⁸ ufp WR intranasal	Control (PBS)
Corazón			
Estómago			
Hígado			
Intestino delgado			

Intestino grueso			
Pulmón			

Discusión

MEL-1 es un virus recombinante que incorpora el gen de la proteína reguladora E2 del virus de papiloma bovino en un vector MVA. Esta construcción ha probado ser un efectivo agente terapéutico contra cáncer cervicouterino. Observaciones en estudios preclínicos han mostrado que MEL-1 no produce reacciones adversas en animales inmunocompetentes o aún inmunodeficientes. Aunado a ello, el vector, MVA, ha sido exhaustivamente estudiado y posee un excelente registro de seguridad y eficacia. Sin embargo, debido a su utilización como vacuna humana es de primordial importancia investigar exhaustivamente los posibles efectos adversos del virus recombinante ha nivel microscópico y microscópico *in vivo*.

Con esta motivación el presente estudio pretende determinar alteraciones clínicas, hematológicas, histológicas o conductuales así como buscar componentes virales en ratones inoculados con MEL-1. Para ello grupos de ratones Balb/c fueron inoculados en dos ocasiones con tres diferentes dosis de MEL-1 por vía subcutánea o con PBS como control negativo. La segunda inoculación ocurrió 15 días después que la primera, el experimento completo duró 30 días. Durante este tiempo fueron tomadas mediciones de peso, temperatura, consumo de alimento y se registró cualquier reacción local en el sitio de la inyección. Al finalizar el experimento fueron tomadas muestras de sangre para realizar hemogramas y bioquímica sanguínea, muestras de tejido de la mayoría de los órganos para realizar histopatología o determinar la presencia del virus. Para contar con un control positivo en la determinación de componentes virales, se inoculó intranasalmente una dosis infectiva del virus no atenuado de vaccinia WR, cuyos órganos fueron procesados ocho día después (momento en el presentaba síntomas inequívocos de la infección) para buscar componentes virales.

La elección del número de dosis (2) fue el resultado de considerar la aparición de posibles efectos alérgicos posteriores a la aplicación de la segunda dosis y debidos a una respuesta inmune inducida por la primera exposición al virus. La elección del tamaño de las dosis permite abarcar desde una fracción hasta el doble de la dosis terapéutica empleada en humanos, aplicada a un animal 2000 veces menor en masa. Aun cuando los hallazgos en el sistema murino no pueden ser directamente extrapolados a humanos, el razonamiento que subyace a esta parte del diseño experimental es que las reacciones a dosis muy altas del virus en ratones son poco probables sean manifestadas en humanos inmunizados con dosis menores.

Luego de las inoculaciones se encontró un abultamiento y un enrojecimiento del sitio de la inyección en varios animales de todos los tratamientos, incluido el control negativo. El primero de los cuales se cree corresponde a la distensión del tejido provocado por el volumen de líquido introducido y que no puede ser drenado inmediatamente de la zona. El ligero enrojecimiento de la piel en el sitio de inyección se cree es una reacción inflamatoria local debida a la ruptura de tejidos por el procedimiento de inyección y no por una respuesta inmune contra los antígenos virales. Esta conclusión es apoyada por la observación de que el enrojecimiento de la zona de inyección en los animales inoculados con la dosis más alta del virus fue similar en intensidad a la primera y por observaciones similares en otros estudios preclínicos.

El que no se encontraran abscesos en el sitio de inyección sugiere que el virus no produce la lisis de los tejidos circundantes, esta aseveración es apoyada por la observación del desarrollo de abscesos en el mismo sitio en ratones inoculados subcutáneamente con una dosis similar del virus WR (no mostrado). Lo anterior en conjunto con observaciones de la nula capacidad de MEL-1 para replicarse en líneas

celulares de mamífero BSC-1 y Vero (comunicación personal Dr. Rosales) parecen sugerir que no hubo replicación al menos en el sitio de la inyección en los ratones. Sin embargo, la posibilidad de que el virus MEL-1 infecte a otros tejidos lejos del sitio de inyección obliga a no adelantar una conclusión prematura y proponer la realización de experimentos que determinen la distribución del virus / proteínas / genoma en tejidos de otras partes del cuerpo a diferentes tiempos de infección.

La ausencia de alteraciones en el peso de los ratones macho tratados con MEL-1 (aún en la dosis de 10^8 ufp) indica que los animales no dejaron de comer o beber de manera normal después de la primera inoculación con el virus, más aún, la ausencia de alteraciones posteriores a la segunda inmunización sugieren que la reacción inflamatoria de la respuesta inmune montada contra el virus no es lo suficientemente fuerte para alterar la conducta alimenticia de los animales.

En el caso de las hembras, la prueba estadística permitió encontrar un aumento en el peso de los animales tratados con 10^8 ufp de MEL-1 y el control con PBS, sin embargo, tal alteración correspondía a un aumento de peso de un solo animal, mientras que se esperaba un ayuno y la correspondiente pérdida de peso por la infección del virus, más aún, que la alteración solo pudo ser detectada 24 horas después de la infección, tiempo que no es suficiente para la multiplicación del virus. Podría suponerse sin embargo que el aumento de peso podría ser motivado por retención de líquidos o materia fecal, sin embargo se observó en ese ratón en particular deyecciones durante el pesaje, es probable por tanto que las alteraciones del peso sean debida al estrés de la inmunización del día previo o a condiciones anteriores del espécimen.

El resto de los animales en este grupo mostró variaciones de peso similares al control. El que tampoco se encontraran alteraciones posteriores a la segunda inmunización permite

suponer que la presunta respuesta inflamatoria contra el virus no fue suficientemente intensa como para evitar que los animales siguieran alimentándose.

Para corroborar el que los animales no alteraron su patrón de consumo de alimento debido al tratamiento con MEL-1, se determinó la cantidad de alimento promedio que cada animal ingirió durante el experimento, para ello se llevó el conteo de la cantidad comprimidos que cada caja consumió y se dividió entre la duración del experimento (30 días) multiplicada por el número de ratones en la caja. Este método sin embargo, presenta fallas importantes: a) los ratones comen un poco de cada comprimido simultáneamente, por lo que después de varios días, aun podría haber la misma cantidad de comprimidos que al inicio aunque solo una fracción del peso total inicial, b) no es posible determinar el consumo de cada ratón, puesto que todos los animales en una caja tienen acceso a la misma comida y c) no es posible determinar la variación diaria del consumo. Debido a lo anterior, no se contó con suficientes datos para poder realizar una prueba estadística que permitiera analizar las diferencias de consumo.

Para tratar de determinar un posible incremento en la temperatura de los ratones tratados como respuesta ante la infección del virus se determinó su temperatura óptica en los días subsecuentes a las dos inoculaciones. La ausencia de fiebre en los días posteriores a la primera inoculación en los tres grupos tratados con MEL-1, sugiere que el virus no establece una infección productiva en el ratón, por lo que su sistema inmune no genera una respuesta inflamatoria con el consecuente aumento de temperatura. Quince días después de la primera inoculación del virus, los ratones debieron haber montado una respuesta inmune específica contra este, una segunda exposición al virus desencadenaría una respuesta inflamatoria mas intensa que la primera, sin embargo no se detectó ninguna alteración de la temperatura durante esta fase del experimento, por lo

que se sugiere que la respuesta inmune secundaria de los ratones no fue lo suficientemente intensa como para alterar visiblemente este parámetro, esto es apoyado por algunos estudios que han encontrado que la respuesta inmune contra MVA es significativamente menos intensa que contra otras cepas de vaccinia (lo cual constituye una ventaja para su uso como vector).

Aun cuando no hallan sido detectadas alteraciones en el peso o temperatura de los animales, resulta importante caracterizar una posible infección persistente del virus en los tejidos del ratón. Estudios previos han mostrado que la expresión de un gen reportero codificado por un virus MVA solo puede ser detectado en varios órganos a las 24 horas después de ser administrado a ratones por vía subcutánea, no encontrándose sin embargo, ninguna señal a las 48 horas²⁶. Debido a su uso como vacuna, en el caso de MEL-1 resulta de mayor importancia su persistencia a largo plazo, en el presente proyecto, se buscó determinar la presencia de componentes virales en varios órganos de los animales tratados 15 días después de la última inoculación del virus. Como control para validar la técnica se inoculó intranasalmente un ratón con un virus vaccinia WR, el cual se sabe es capaz de replicarse en mamíferos, como se esperaba el animal mostró una clara señal positiva en la capa celular que cubre a los bronquiolos. El que zonas adyacentes a esta capa celular también presentasen una señal positiva sugiere que al menos en parte la diseminación del virus fue debida a una replicación posterior a la infección. El resultado además valida la técnica, ya que el anticuerpo empleado presenta reactividad contra ambos virus.

Las pruebas inmunohistoquímicas no mostraron zonas positivas en ninguno de los órganos analizados de los ratones tratados con MEL-1. Sin embargo, aun cuando se sabe que MVA y MEL-1 no pueden replicarse productivamente en células^{17, 18, 19}, por el tiempo

transcurrido desde la inoculación este resultado no permite determinar si el virus no infectó los tejidos de los órganos analizados o si lo hizo y fue degradado. Debido a las diferencias en las vías de administración de MEL-1 y WR, no es posible comparar ambos resultados. En los tres tratamientos (PBS, WR y MEL-1) el contenido intestinal presenta una aparentemente fuerte señal positiva, sin embargo esto suponemos, es debido a una afinidad inespecífica con el cromógeno y no a la presencia de componente virales, ya que aun el control negativo lo presenta.

Aún en virus no citopáticos, la proliferación de linfocitos T citotóxicos puede producir lesiones místicas en diversos órganos, como la meningitis en ratones infectados por el virus de la coriomeningitis linfocítica o los cúmulos de linfocitos en los hígados de pacientes portadores del virus de la hepatitis. La respuesta inmune contra otros virus puede provocar la formación de inmunocomplejos circulantes que provocan una vasculitis sistémica⁴⁵. Es por tanto importante determinar la integridad estructural de muestras de los diferentes tejidos de los ratones. El análisis de las micrografías de los órganos de ratones tratados con PBS y MEL-1 no mostró alteraciones en la estructura microscópica en ninguno de los órganos analizados, esto sugiere que la infección del virus MEL-1 no altera perceptiblemente los órganos analizados y que además no se provocaron alteraciones adversas debidas a la respuesta inmune contra el virus. Sin embargo una confirmación mas certera provendría del análisis por microscopio electrónico de transmisión de tejidos recientemente infectados por MEL-1.

La inmunidad adaptativa frente a las infecciones víricas depende de los anticuerpos neutralizantes y de los linfocitos T citotóxicos, por lo que fue importante determinar la alteración en las poblaciones celulares sanguíneas mediante la realización de hemogramas y bioquímicas sanguíneas. Se observó una amplia variación en la población

de linfocitos de los animales tratados con MEL-1 (3.1 a $8.7 \times 10^9 / L$), por lo que no es posible determinar si la alteración es debida al estímulo antigénico del virus o a causas del manejo o inespecíficas de los animales. Por lo tanto, aunque es sabido que la citotoxicidad estimulada por MEL-1 es mediada por macrófagos, resultaría de interés cuantificar la población de linfocitos T citotóxicos específicos contra el virus a diferentes tiempos luego de la inoculación del virus en un número mayor de animales³⁷. Los resultados del hemograma no muestran alteraciones en el resto de los parámetros respecto al control o al rango normal. Los resultados de la bioquímica muestran un marcado incremento en los niveles séricos de la enzima alaninamino transferasa (ALT), así como en la creatinina, lo cual sugiere un posible daño hepático, sin embargo como se mencionó arriba, el análisis de la estructura microscópica del hígado no mostró alteraciones perceptibles. La presencia de un coágulo en la muestra (que altera específicamente los niveles de ALT) dificulta el concluir al respecto. Sería positivo repetir el experimento para determinar con un mayor número de muestras el efecto del virus sobre este órgano.

Conclusiones

El virus MEL-1 no ocasiona alteraciones de peso o temperatura al ser administrado subcutáneamente en dosis altas a ratones Balb/c.

No es posible detectar una infección persistente del virus después de 15 días de inoculado por vía subcutánea, al menos en los órganos analizados.

El virus MEL-1 no ocasiona alteraciones en la estructura de los órganos analizados al ser administrado subcutáneamente en dosis altas a ratones Balb/c.

Sugerencias

La técnica empleada para detectar al virus no permite la detección específica de su material genético, sería por tanto importante probar que el genoma viral no es preservado en las células infectadas como episoma o integrado al genoma celular.

Ya que el esquema de vacunación empleado en humanos consta de 5 dosis, resultaría provechoso caracterizar la respuesta inmune en ratones después de un programa de al menos este número de dosis.

Una proporción de las pacientes potencialmente tratables con esta vacuna se encuentra en etapa reproductiva, y, aunque el protocolo de vacunación excluye a las pacientes embarazadas, aun existe una probabilidad de embarazo durante el tratamiento, así, un estudio útil y previsor sería el determinar el efecto sobre el desarrollo de los neonatos de ratones gestantes.

1. Parkin DM, Bray F, 2006, Chapter 2: The burden of HPV related cancers, Vaccine, 24S3, S3/11-S3/25.
2. Bosch FX, Sanjosé S, 2003, Chapter 1: Human Papillomavirus and Cervical Cancer – Burden and Assessment of Causality, Journal of the National Cancer Institute Monographs 31: 3-13.
3. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah Kv, et. Al., 1999, Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide, Journal of Pathology, 189: 12-9.
4. Moscicki AB, Schiffman M, Kjaer S, Villa LL, 2006, Chapter 5: Updating the natural history of HPV and anogenital cancer, Vaccine, 24S3, S3/43-S3/51.
5. Castellsagué X, Bosch FX, Muñoz N, 2002, Environmental co-factors in HPV carcinogenesis, Virus Research, 89: 191-199.
6. Schiffman M, Krüger KS, 2003, Chapter 2: Natural History of Anogenital Human Papillomavirus Infection and Neoplasia, Journal of the National Cancer Institute Monographs 31: 14-19.
7. Christensen ND, 2002, Papillomaviruses, Encyclopedia of Life Sciences, 1pp.
8. Herrero R, 2003, Chapter 7, Human Papillomavirus and Cancer of the upper Aerodigestive Tract, Journal of the National Cancer Institute Monographs 31: 47-51.
9. Pfeiser H, 2003, Chapter 8: Human Papillomavirus and Skin Cancer, Journal of the National Cancer Institute Monographs 31: 52-56.
10. Münger K, Howley PM, 2002, Human papillomavirus immortalization and transformation functions, Virus Research 89: 213-228.
11. Longworth MS, Laiminis LA, 2004, Pathogenesis of Human Papillomaviruses in Differentiating Epithelia, Microbiology and Molecular Biology Reviews 68(2): 362-372.

12. Munger K, Howley PM, 2002, Human papillomavirus immortalization and transformation functions, *Virus Research*, 89: 213-228.
13. Fenner F, 2000, Adventures with poxviruses of vertebrates, *FEMS Microbiology Reviews* 24: 123-133.
14. Smith G, Vanderplasschen A, Law M, 2002, The formation and function of extracellular enveloped vaccinia virus, *Journal of General Virology* 83: 2915-2931.
15. Spehner D, Drillien R, Proamer, et. Al., 2000, Enveloped virus is the major virus form produced during productive infection with modified vaccinia virus Ankara strain, *Virology* 273: 9-15.
16. Moss B, 1996, Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety, *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 93:11341-11348. 11341.pdf
17. Carroll M, Moss B, 1997, Host Range and Cytopathogenicity of the Highly Attenuated MVA Strain of Vaccinia Virus: Propagation and Generation of Recombinant Viruses in non a Nonhuman Mammalian Cell Line, *Virology* 238: 198-211.
18. Pastoret PP, Vanderplasschen A, 2003, Poxviruses as vaccine vectors, *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases* 26: 343-355.
19. Carroll MW, Overwijk WW, Chamberlain RS, Highly attenuated modified vaccinia virus Ankara (MVA) as an effective recombinant vector: a Murine tumor model, *Vaccine* 15: 387-394.
20. Sutter G, Moss B, 1992, Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes, *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 89: 10847-10851.
21. Wyatt L, Carroll MW, Czerny CP, Merchlinsky M, Sisler JR, Moss B, 1998, Marker rescue of the host range restriction defects of Modified Vaccinia Virus Ankara, *Virology* 251: 334-342.

22. Rolph MS, Ramshaw IA, 1997, Recombinant viruses as vaccines and immunological tools, *Current Opinion in Immunology* 9: 517-519.
23. Stittelaar KJ, 2001, (Editorial) MVA: A cuckoo in the vaccine nest?, *Vaccine* 19: v-vi.
24. Stittelaar K, Kuiken T et. al., 2001, Safety of modified vaccinia virus Ankara (MVA) in immune-suppressed macaques, *Vaccine* 19: 3700-3709.
25. Wyatt LS, Earl PL, Eller LA, Moss B, 2004, Highly attenuated smallpox vaccine protects mice with and without immune deficiencies against pathogenic vaccinia virus challenge, *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 101(13): 4590-4595.
26. Hanke T, McMichael AJ, Samuel RV, Powell LAJ, McLoughlin L, Crome SJ, Edwin, 2002, Lack of toxicity and persistence in the mouse associated with administration of candidate DNA – and modified vaccinia virus Ankara (MVA)-based HIV vaccines for Kenya, *Vaccine* 21: 108-114.
27. Ramirez JC, Finke D, Esteban M, Kraehenbuhl JP, Acha-Orbea H, 2003, Tissue distribution of the Ankara strain of vaccinia virus (MVA) after mucosal or systemic administration, *Archives of Virology* 148: 827-839.
28. Shiver J, Fu TM, Chen L, et. al., 2002, Replication-incompetent adenoviral vaccine vector elicits effective anti-immunodeficiency-virus immunity, *Nature* 415: 331-335.
29. Cosma A, Nagaraj R, Bühler S, Hinkula J, Busch DH, Sutter G, Goebel FD, Erfle V, 2003, Therapeutic vaccination with MVA-HIV-1 nef elicits NEF-specific T-helper cell responses in chronically HIV-1 infected individuals, *Vaccine* 22: 21-29.
30. Stittelaar KJ, Wyatt LS, De Swart RL, Helma S, Vos HW, Groen J, van Amerongen G, van Binnendijk R, Rozenblatt S, Moss B, Osterhaus ADME, 2000, Protective Immunity in Macaques Vaccinated with a Modified Vaccinia Virus Ankara-Based

Measles Virus Vaccine in the Presence of Passively Acquired Antibodies, *Journal of Virology* 74(9): 4236-4243.

31. Roque-Reséndiz JL, Rosales R, Herion P, 2004, MVA ROP2 vaccinia virus recombinant as a vaccine candidate for toxoplasmosis, *Parasitology* 128: 397-405.

32. Moorthy VS, McConkey S, Roberts M, Gothard P, Arulanantham N, Degano P, Schneider J, Hannan C, Gilbert SC, Peto TEA, Hill AVS, 2003, Safety of DNA and modified vaccinia virus Ankara vaccines against liver-stage *P. falciparum* malaria in non-immune volunteers, *Vaccine* 21: 1995-2002.

33. Moorthy VS, Imoukhuede EB, Milligan P, Bojang K, Keating S, Kaye P, Pinder M, Gilbert SC, Walraven G, Greenwood BM, Hill AVS, 2004, A randomized, double-blind, controlled vaccine efficacy trial of DNA/MVA ME-TRAP against malaria infection in Gambian adults, *PLOS Medicine* 1(2): 128-136.

34. Gherardi MM, Nájera JL, Pérez-Jiménez E, Guerra S, García-Sastre A, Esteban M, 2003, Prime-boost immunization schedules based on influenza virus and vaccinia virus vectors potentiate cellular immune responses against human immunodeficiency virus Env protein systemically and in the genitoretal draining lymph nodes, *Journal of Virology* 77(12): 7048-7057.

35. Bejon P, Peshu N, Gilbert SC, Lowe BS, Molyneux CS, Forsdyke J, Lang T, Hill AV, Marsh K, 2006, Safety profile of the viral vectors of attenuated fowlpox strain FP9 and modified vaccinia virus Ankara recombinant for either of 2 preerythrocytic malaria antigens, ME-TRAP or the circumsporozoite protein, in children and adults in Kenya, *Clinical Infectious Diseases* 42(8): 1102-10.

36. Olszewska w, Suezer Y, Sutter G, Openshaw PJ, Protective and disease-enhancing immune responses induced by recombinant modified vaccinia Ankara (MVA) expressing respiratory syncytial virus proteins, *Vaccine* 23(2): 215-21.

37. Valdez GV, Sutter G, José MV, García CA, Erfle V, Moreno MN, Merchant H, Rosales R, 2000, Human tumor growth is inhibited by a vaccinia virus carrying the E2 gene of bovine papillomavirus, *Cancer* 88(7): 1650- 62.

38. Rosales C, Valadez GV, Arrellin RG, Merchant H, Rosales R, 2000, A recombinant vaccinia virus containing the papilloma E2 protein promotes tumor regresión by stimulating macrophage antibody-dependent cytotoxicity, *Cancer Immunology and Immunotherapy* 49:347-360.

39. Tinoco A, López M, Navarro T, *et. al.*, 2002, A phase II study: Efficacy of the Gene Therapy of the MVA E2 Recombinant Virus in the Treatment of Pre-cancerous Lesions (NIC I and NIC II) Associated with Infection of Oncogenic Human Papillomavirus, *Human Gene Therpay* 13(9): 1127-40.

40. Norma Oficial Mexicana NOM-014-SSA2-1994, Para la prevención, tratamiento y control de cáncer del cuello del útero y de la mama en la atención primaria.

41. Corona CM, Tinoco A, Navarro T, Contreras ML, Risco R, Calzado P, Reyes L, Posternak R, Morosoli G, Lara M, R Rosales, 2004, Therapeutic vaccination with MVA E2 can eliminate precancerous lesions (CIN 1, CIN 2, and CIN 3) associated with infection by oncogenic human papillomavirus, *Human Gene Therapy* 15: 421–431.

42. García E, González JL, Andrade A, Contreras ML, Padilla S, Guzmán CC, Jiménez R, Reyes L, Morosoli G, Verde M y Rosales R, 2006, Regression of papilloma high-grade lesions (CIN 2 and CIN 3) is stimulated by therapeutic vaccination with MVA E2 recombinant vaccine, *Cancer Gene Therapy* 13: 592-597.

43. Schnell MA, Ardí C, Hawley M, Propert KJ y Wilson JM, 2002, Effect of blood collection technique in mice on clinical pathology parameters, *Human Gene Therapy* 13: 155-162.

44. Donovan J, Brown P, 1995, Care and handling of laboratory animals, *Current Protocols in Immunology*, suplemento 14: 1.0.3-1.0.6.

45. Abbas AK, Lichtman AH, 2004, Inmunología celular y molecular, Elsevier, Madrid, 356-57 pp.