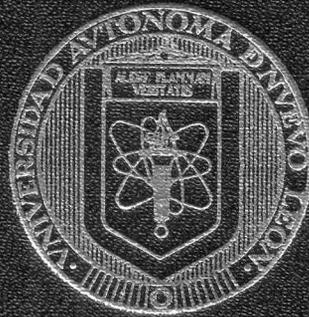


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCION DE POSTGRADO



EXPRESION DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES PARA
gp120 DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA
TIPO 1 SUBTIPO B EN CULTIVOS DE CELULAS DE INSECTO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

PRESENTA:

BIOL. GERARDO RAMOS ALFANO

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

MAYO DEL 2004

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCION DE POSTGRADO



EXPRESION DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES PARA
gp120 DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA
TIPO I SUBTIPO B EN CULTIVOS DE CELULAS DE INSECTO

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGIA

PRESENTA:

BIOL. GERARDO RAMOS ALFANO

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L.

MAYO DEL 2004

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
SUBDIRECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



**EXPRESIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES PARA gp120 DEL VIRUS
DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA TIPO 1 SUBTIPO B EN CULTIVOS DE
CÉLULAS DE INSECTO**

T E S I S

**QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN INMUNOBIOLOGÍA**

P R E S E N T A

BIOL. GERARDO RAMOS ALFANO

COMISIÓN DE TESIS

DRA. PATRICIA TAMEZ GUERRA
PRESIDENTE

DRA. LYDIA G. RIVERA MORALES
SECRETARIO

DRA. CRISTINA RODRÍGUEZ PADILLA
PRIMER VOCAL

DR. RICARDO A. GÓMEZ FLORES
SEGUNDO VOCAL

DRA. LAURA A. PALOMARES AGUILERA
TERCER VOCAL

CIUDAD UNIVERSITARIA, MAYO DE 2004

LUGAR DE TRABAJO

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Inmunología y Virología del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología del
gobierno mexicano por brindarme su apoyo con
las becas de cuotas escolares y manutención

Becario No. 153976

AGRADECIMIENTOS

Gracias Dios por darme la vida, gracias Dios por permitirme aprender tropezándome, gracias por mi familia, por mis amigos, por mi trabajo, pero sobre todo por nunca dejarme en los momentos de aflicción dándome fortaleza y prudencia para buscar el perdón.

Agradezco a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla y al Dr. Reyes Tamez Guerra por permitirme formar parte de su equipo de trabajo durante la realización de este trabajo de investigación.

Al Dr. José Santos García Alvarado, Director de la Facultad de Ciencias Biológicas, y a la Dra. Julia Verde Star, Subdirectora de Postgrado, por los apoyos económicos brindados sin los cuales hubiera sido imposible realizar la presentación de éste trabajo de investigación en foros nacionales.

De una manera muy especial a mis asesores:

Dra. Patricia Tamez Guerra por confiar en un servidor para abrir la línea de investigación de baculovirus recombinante.

Dra. Lydia G. Rivera Morales por enseñarme todos sus conocimientos en la biología molecular del VIH.

Dra. Cristina Rodríguez Padilla por proponer finas estrategias de trabajo para mejorar el proyecto.

Dr. Ricardo A. Gómez Flores por sus atinados comentarios para enfocar el proyecto.

Dra. Laura A. Palomares Aguilera y al Dr. Octavio T. Ramírez Revich por recibirme en su laboratorio y apoyarme para la realización de varios experimentos.

A todos ellos agradezco la paciencia, entrega y disponibilidad para atenderme así como el brindar una asesoría más que una guía de métodos.

A mis tutores de postgrado Dr. Roberto Montes de Oca Luna, Dr. Juan Manuel Alcocer González y Dr. Javier Ramos Jiménez por los comentarios, propuestas y evaluaciones que realizaron al proyecto.

A todos los compañeros de laboratorios que de una manera u otra apoyaron para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

A mis padres, Héctor y Aída, les entrego este documento como pequeña parte de la gran deuda que tengo con ustedes, los quiero.

Al M.C. Juan Manuel Adame Rodríguez y a la Dra. Lydia G. Rivera Morales por el apoyo desinteresado brindado por años, mi más sincero agradecimiento.

A mis hermanos, Héctor, Aída y Mayela por su amor y compañía.

A todas mis amistades por representar cada uno momentos inolvidables en mi vida.

*Porque nada hay encubierto, que no haya de descubrirse;
ni oculto, que no haya de saberse.*

Lucas 12:2

ÍNDICE

Financiamiento	i
Lugar de trabajo	ii
Agradecimientos	iii
Dedicatoria	vi
Índice	vii
Índice de figuras y diagramas	ix
Índice de tablas	xi
Abreviaturas	xii
1. Justificación	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	4
3.1 Síndrome de inmunodeficiencia adquirida	4
3.1.1 Características del VIH-1	6
3.1.2 Subtipos de VIH-1	7
3.1.3 Genoma y estructura del virión	10
3.1.4 Ciclo replicativo del VIH-1	12
3.1.5 Producción de vacunas contra el VIH	16
3.2 Baculovirus silvestre	19
3.2.1 Ciclo replicativo del baculovirus silvestre	20
3.3 Sistemas de expresión de proteínas recombinantes	21
3.3.1 <i>Escherichia coli</i>	21
3.3.2 Levaduras	22
3.3.3 Células de mamífero en cultivo	23
3.3.4 Células de insecto(vectores de expresión baculovirales)	24
3.3.4.1 Líneas de células de insecto	27
3.3.4.2 Baculovirus recombinante	28

**3.3.4.3 Producción de vacunas contra el VIH
utilizando un sistema de expresión
de baculovirus**

29

4. Objetivo general	35
5. Objetivos específicos	35
6. Hipótesis	36
7. Material y métodos	37
8. Resultados	58
9. Discusión	70
10. Conclusiones	74
11. Perspectivas	75
12. Resumen	77
13. Literatura citada	78

ÍNDICE DE FIGURAS Y DIAGRAMAS

Figura 1.- Estructura del VIH-1	12
Figura 2.- Distribución del genoma del VIH-1	12
Figura 3.- Ciclo replicativo del VIH-1	16
Figura 4.- Reacción de PCR anidado de la gp120	59
Figura 5.- Digestión con <i>EcoRI</i> de plásmidos insertados con la gp120 del VIH-1 del paciente No. 69	61
Figura 6.- Digestión con <i>EcoRI</i> de plásmidos insertados con la gp120 del VIH-1 del plásmido HXB2	61
Figura 7.- Digestión parcial con <i>KpnI</i> de plásmidos conteniendo la gp120 del VIH-1	62
Figura 8.- Digestión completa con <i>EcoRI</i> de los plásmidos pTTA-120-69-3 y pTTA-120-HX-9	63
Figura 9.- Análisis de restricción de plásmidos pFB1-HX con <i>EcoRI</i> y <i>SalI</i>	64
Figura 10.- Análisis de restricción de plásmidos pFBI-69 con <i>EcoRI</i> y <i>SalI</i>	64
Figura 11.- Análisis fenotípico de colonias contenido bécidos en medio LB con kanamiana, X-gal e IPTG	66
Figura 12.- Análisis fenotípico de colonias conteniendo bécidos en medio LB con ampicilina	66
Figura 13.- Electroforesis en gel de poliacrilamida del lisado celular total de <i>Sf9</i> transfectadas con los bécidos recombinantes	68
Figura 14.- Detección con anticuerpo monoclonal gp120 de la proteína recombinante gp120 en lisado celular total de células <i>Sf9</i>	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.- Distribución global de los subtipos de VIH-I	9
Tabla 2.- Características relevantes del IC-BEVS	28
Tabla 3.- Sistemas de producción de baculovirus para la producción de vacunas	32

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxiribonucleico
AcMNPV	Virus del poliedro nuclear con inserciones múltiples de <i>Autographa californica</i>
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
°C	Grados centígrados
CO ₂	Dióxido de carbono
CTLs	Linfocitos T citotóxicos
FDA	Agencia federal de control de alimentos y fármacos de los Estados Unidos de Norteamérica
GNV	Granulovirus de la Familia Baculoviridae
h	Horas
hpi	Horas post infección
HTLV-I,-II,-III	Virus linfotrópico de las células T humanas (Tipo I a III)
IC-BEVS	Sistema de vectores de expresión baculovirales en células de insecto en cultivo
kDa	Kilodaltones
LAV	Virus asociado a linfadenopatía
mg	Miligramos
µg	Microgramos
min	Minutos
mL	Mililitros
µL	Microlitros
mM	Milimolar
MNPV	Virus del poliedro nuclear con inserciones múltiples
ng	Nanogramos
nm	Nanómetros
NPV	Nucleopoliedrovirus de la Familia Baculoviridae
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa

pb	Pares de bases de una cadena
rpm	Revoluciones por minuto
seg	Segundos
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SIV	Virus de inmunodeficiencia del simio
SNPV	Virus del poliedro nuclear con inserciones sencillas
VIH-1,-2	Virus de inmunodeficiencia humana (Tipo 1 ó 2)
VLP's	Partículas o estructuras similares a los virus

1. JUSTIFICACIÓN

Los sistemas de producción de proteínas recombinantes han avanzado durante las últimas 2 décadas. Al momento, en nuestra institución, éste tipo de sistemas se ha implementado con bacterias comensales lácticas y *Escherichia coli* y con la levadura *Pichia pastoris*, por destacar los principales. Cada sistema de expresión cuenta con ventajas y desventajas técnicas, de factibilidad operativa y económica, entre otras. Sin embargo, en la actualidad el sistema de vectores de expresión baculovirales en células de insecto en cultivo tiene más ventajas con respecto a otros, dado que facilita los procesos postraduccionales complejos de las células eucarióticas a un bajo costo. Asimismo, se consideró de gran importancia el contar con un baculovirus que expresara la gp120 del VIH-1, debido a su poder infectivo pandémico, y a la poca eficiencia que han mostrado otros modelos vacunales.

2. INTRODUCCIÓN

Las proteínas recombinantes o heterólogas, son proteínas que han sido producidas en un organismo diferente al que de manera natural las sintetiza, utilizando tecnología de ADN recombinante. Esta tecnología ha tenido gran desarrollo en los últimos 20 años, desde producción de proteínas hasta la generación de animales transgénicos.

En general, se reconocen varios sistemas para la expresión de proteínas recombinantes, cada uno con ventajas y desventajas inherentes al tipo celular, la estructura y función del polipéptido a sintetizar, el desarrollo del proceso a escalar y hasta factores externos, tal como el grado de conocimientos adquiridos por el investigador.

Por otra parte, el desarrollo de una vacuna segura y efectiva en contra del VIH es una necesidad mundial para el control de la pandemia del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). Aunque existen actividades de educación y prevención, estas no han sido suficientes para detener la diseminación de la enfermedad y lograr el crecimiento sano de la población mundial. Por lo tanto, es necesario producir una vacuna contra el VIH que sea segura y efectiva.

Una de las estrategias más utilizada para prevenir la infección de nuevas células y eliminar las infectadas por el VIH, es el uso de la glicoproteína de 120 kDa de la envoltura del virus (gp120). Esta proteína tiene la función de interactuar con los receptores de membrana de las células blanco, para internalizar el virus; por lo anterior, es considerada como la subunidad idónea para generar la respuesta inmune humoral y celular.

El sistema de células de insecto-vectores de expresión baculoviral, ha sido empleado para la elaboración de productos clínico-farmacéuticos, como

vacunas para virus de boca y pies, interferón y anticuerpos monoclonales; a la fecha se reconocen 16 proteínas recombinantes derivadas de cultivos celulares de insectos, las cuales son cerca de la mitad de las producidas por tecnología de ADN recombinante aprobadas para su aplicación en el mercado libre, y son inocuas a mamíferos. Además, los bioprocesos son económicos y fácilmente escalables, destacando por encima de lo anterior el llevar a cabo procesos pos-traduccionales complejos, tales como la O-glicosilación y N-glicosilación.

En el presente trabajo se propuso desarrollar e implementar el sistema de producción de proteínas recombinantes en baculovirus producidos en cultivos de células de insecto, teniendo por objetivo el producir un baculovirus recombinante que exprese la gp120 del VIH-1.

3. ANTECEDENTES

3.1 SÍNDROME DE INMUNODEFICIENCIA ADQUIRIDA

El síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) es una enfermedad producida por el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), que fue descrita por primera vez en la década de los 80's. Esta enfermedad es infecciosa y transmisible, y se caracteriza por ser una alteración adquirida, severa e irreversible de la inmunidad celular, que predispone al paciente a infecciones graves por microorganismos oportunistas y/o al desarrollo de neoplasias. Es por esto que representa un elevado índice de mortalidad (Gottlieb y cols, 1981; CDC, 1982; Mildvan y cols, 1982 y Sonnabend, 1983).

Al igual que en otros países, en México el SIDA representa uno de los problemas de salud pública más importante, por su facilidad de transmisión, el costo del tratamiento y el potencial de fallecimiento a causa del mismo (CDC, 1982). En 1983 comenzaron a reportarse los primeros casos de SIDA en México, mismos que habían iniciado en 1981, año en que se considera el inicio de la epidemia. Los primeros casos de SIDA fueron reconocidos por un grupo de enfermedades inusuales como neumonía, causada por *Pneumocystis carinii*, o el Sarcoma de Kaposi, que se presentaron en hombres homosexuales jóvenes (Sonnabend, 1983). Además, se observó un patrón de inmunodeficiencia clínica. Como la mayoría de los casos estaban asociados a individuos homosexuales, se pensó que podría estar relacionado al estilo de vida de ésta población. Los casos de SIDA fueron inmediatamente reportados en otro grupo de población, incluyendo drogadictos y hemofílicos. Los grupos antes mencionados pudieron no estar expuestos a dosis inmunoestimuladoras de esperma extraño, como es el caso de los homosexuales, sino a exposición frecuente de ciertos antígenos tisulares o a proteínas extrañas. En el caso de los pacientes hemofílicos, habían recibido factores de la coagulación de plasma obtenidos de diversos donadores,

mientras los drogadictos llevaban a cabo el intercambio de jeringas contaminadas con pequeñas cantidades de sangre proveniente de otro drogadicto (CDC, 1982). Posteriormente, esta enfermedad fue observada en individuos que habían recibido alguna transfusión sanguínea (Curran y cols, 1984; Jaffe y cols, 1984) y en niños provenientes de madres que tenían la enfermedad o eran drogadictas (Oleske y cols, 1983; Rubinstein y cols, 1983; Piot y cols, 1984). Asimismo, otra observación importante que se hizo fue que todos estos pacientes presentaban una disminución de sus linfocitos T cooperadores (Masur y cols, 1981).

En un principio se pensó que el agente causal de esta enfermedad podía haber sido un microorganismo más virulento que había mutado, o bien una variante genética recombinante. Además, se presumía que se podía tratar del virus de la Hepatitis B, ya que se encontró en una gran proporción de homosexuales y también en personas que habían recibido alguna transfusión. Por otra parte, también se involucró como patógeno el virus de Epstein-Barr por ser linfotrópico, y a la enfermedad con el Citomegalovirus, porque estaba asociada a una inmunosupresión.

Diferentes investigadores (Barre-Sinoussi y cols, 1983; Essex y cols, 1983; Gallo y cols, 1983) postularon que el agente causal del SIDA podría ser una variante del Virus Linfotrópico de las Células T Humanas (HTLV), descubierto por Gallo en 1980. Entre las razones de este postulado estaba que el HTLV fue el único virus humano capaz de infectar a las células T cooperadoras, además que también es transmitido por las mismas vías que el agente causal del SIDA: sexual, sanguínea y vertical. El nombre que recibió posteriormente el agente causal fue el de Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo 1 (VIH-1), al que en un principio se le conocía como Virus Linfotrópico de las Células T Humanas Tipo III (HTLV-III) o Virus Asociado a Linfadenopatía (LAV).

Después que el VIH-1 fue reconocido como el agente causal del SIDA, se cuestionó la posibilidad de que este virus tuviera su origen en África, al igual que el HTLV-I. Posteriormente, muestras de suero colectadas de individuos africanos, en años anteriores (1955-1965) fueron examinadas para la presencia de anticuerpos reactivos para los componentes del VIH-1. Se encontró una muestra positiva, la cual fue reactiva para todos los componentes antigénicos mayores del VIH-1: gp160, gp120, gp41, p55, p24 y p17 (Essex y cols, 1997).

3.1.1 CARACTERÍSTICAS DEL VIH-1

El VIH-1 es un retrovirus de la subfamilia de los Lentivirus. Aunque los lentivirus fueron uno de los primeros agentes virales conocidos, el estudio de éstos se intensificó después del descubrimiento del VIH-1, al igual que otros lentivirus (Valle y Carre, 1904; Barre-Sinoussi y cols, 1983; Gallo y cols, 1984; Gonda y cols, 1985; Sonigo y cols, 1985).

Los lentivirus son virus exógenos, no oncogénicos. Causan una infección persistente (crónica al estar activos), manteniendo la enfermedad con muy largos periodos de incubación. Estos virus usualmente infectan células del sistema inmunológico (macrófagos y linfocitos T), causando efectos citopáticos en células permisivas (Ej., sincitios) y muerte celular. Las infecciones lentivirales no son detectadas claramente por el sistema inmunológico, acumulando sus daños por un período de tiempo de muchos años. Esta característica se ve reflejada en el nombre de la subfamilia. Una característica importante que no se encuentra en otros retrovirus, es su habilidad infecciosa para células que no se encuentran en un proceso de división. Comparado con otros retrovirus, los lentivirus tienen un gran genoma de ARN (aproximadamente de 10,000 pb), el cual se acompaña de proteínas adicionales; ello produce una gran proteína de envoltura glicosilada, grande y pesada (Env), y en el caso del VIH, es dependiente de Mg^{2+} .

La replicación de los lentivirus es en general tóxica para la célula y conlleva a la disfunción celular y la muerte. Las propiedades de la estructura y la replicación de éstos, puede ser la razón por la cual el sistema inmune es incapaz de eliminar la infección. Muchas de las propiedades de estructura y función del VIH-1 son comunes a las de todos los retrovirus. Estudios iniciales en el virus del SIDA ayudaron a conocer la existencia de oncoretrovirus. En la década pasada, el descubrimiento del virus del SIDA disparó estudios detallados de su estructura, replicación y propiedades patogénicas. Como resultado, el VIH-1 parece ser el virus más intensamente estudiado, del cual tenemos un muy detallado conocimiento a nivel molecular.

3.1.2 SUBTIPOS DE VIH-1

El VIH-1 está dividido en tres grupos, M (mayor), O (capa exterior) y N (nuevo). El grupo M ha sido subdividido en varios subtipos A-K, éstos fueron originalmente definidos en base a las secuencias de los genes *env* y *gag*. Los subtipos son comúnmente referidos por letras que refleja el orden en el que ellos fueros reconocidos. En un árbol filogenético con disposición radial, todos los subtipos son equidistantes y manifiestan provenir de un hipotético ancestro común (Korber y cols, 1998).

Un grupo aún más distante de los subtipos A-K, es el designado como O. Este se detectó en Camerún y está más relacionado al VIH-1 que a VIH-2. Aunque los subtipos pertenecientes al grupo M tuvieron un progenitor ancestro humano, el grupo O probablemente provino de un chimpancé, aunque algunos virus aparentemente se introdujeron a partir de poblaciones humanas, otros presumiblemente emergieron de recombinantes de un huésped humano único (Korber y cols, 1998).

El VIH-1 puede involucrar mecanismos donde ocurren mutaciones; los retrovirus poseen un genoma de ARN, donde ocurre recombinación frecuente durante la transcripción en reversa. El subtipo E, es un recombinante con una región genética *gag/pol* del subtipo A, pero con región de envoltura de otro subtipo (Brodine y cols, 1997).

Una nueva variante se detectó en una mujer de Camerún, quien tenía una cepa viral que no fue detectada por las pruebas para los dos grupos conocidos del VIH-1 (grupo M y O). La cepa del virus conocida como YBF30, reaccionó positivamente en una prueba para las cepas del virus de Inmunodeficiencia del Simio (SIV), aislada de un chimpancé en Gabón. Cuando el genoma fue secuenciado, el resultado confirmó que pertenecía a un grupo desconocido, el cual se denominó grupo N (new) (Balter, 1998; Simon y cols, 1998).

Aproximadamente el 50% de todas las cepas reportadas pertenecen al subtipo B, 16% al subtipo A, 9% al C, 10% al D, 10% al E y en muy baja proporción al resto de los subtipos F, G y H (Burke y McCutchan, 1997).

El subtipo B es el más estudiado, principalmente porque los virus de este subtipo representan la vasta mayoría de los subtipos circulantes en el mundo occidental. La clara predominancia de los distintos subtipos en ciertos países, permite hacer algunas inferencias acerca de la diseminación del VIH-1. Por ejemplo, que la epidemia en Latinoamérica y Europa occidental, donde predomina el subtipo B, pudieron haberse originado en los Estados Unidos, en donde el subtipo predominante también es el B. La distribución de los subtipos es muy amplia. En la Tabla 1 se menciona la distribución global de los subtipos por regiones (Korber y cols, 1998).

Tabla 1. Distribución global de los subtipos de VIH-1

REGIÓN	ALTA PREVALENCIA	MODERADA A BAJA PREVALENCIA	MUY BAJA PREVALENCIA
Norte América	B		A,C,D,E,O
Europa Occidental	B	A,C,D,F,G	
Centroamérica	B		
América del Sur	B	F	C
Europa del Este	B	A,C,D,F,G	
África del Oeste	A		C, D
África central	A	C, D, E, F, G, H, O	B
África del este	A	D	
Cuerno de África	C	A	
Sud África	C	B	D
Sudeste de Asia	E	B	C
Sur de Asia	C	B	A, E
Oeste de Asia	C		
Australia	B		

El subtipo B también se detecta en México (Soler-Claudin y Gudino-Rosales, 1995; Gudino y cols, 1996; Soto-Ramírez y cols, 1996; Vázquez-Valls y cols, 1996; Soler-Claudin y Gudino-Rosales, 1998; Vázquez-Valls y cols, 1998) como en otros países del continente Americano (Cabello y cols, 1995; Warren y cols, 1995; Campodonico y cols, 1996; Sabino y cols, 1996; Candal y cols, 1997; Lara y cols, 1997; Renjifo y cols, 1999). Los datos epidemiológicos de varios de estos estudios revelaron que el subtipo B está comúnmente asociado a la transmisión homosexual y al uso de drogas (Renjifo y cols, 1999). Sin embargo, los subtipos C y E, que son los subtipos prevalentes en el Sur de Africa, India y Tailandia, están relacionados con la transmisión heterosexual (Essex, 1994). Esto ha llevado a pensar que ciertos subtipos pueden tener diferentes propiedades fenotípicas, resultando en una ventaja selectiva por una vía de transmisión dada (Van Harmelen, 1997). En Tailandia por ejemplo, donde los subtipos B y E están presentes, el subtipo E parece ser más fácilmente transmitido por vía heterosexual que el subtipo B (Kunansont y cols, 1995). No hubo introducciones de otros subtipos de VIH-1 A, C, D y E, como los reportados en Estados Unidos y en Europa Occidental

(Artenstein y cols, 1995; Brodine y cols, 1995; Clewey y cols, 1996; Fransen y cols, 1996).

Con respecto a la investigación sobre SIDA, particularmente en México, durante los últimos años, se han realizado estudios para determinar las cepas de VIH que predominan en el país. Estos demuestran que pertenecen al VIH-1 subtipo B (VIH-1, B) (Rivera-Morales y cols, 2000). La región C2-V5 del virus fue secuenciada de 67 muestras estudiadas; éstas fueron registradas en la base de datos del banco de genes con el número de acceso AF200855-AF200921.

3.1.3 GENOMA Y ESTRUCTURA DEL VIRION

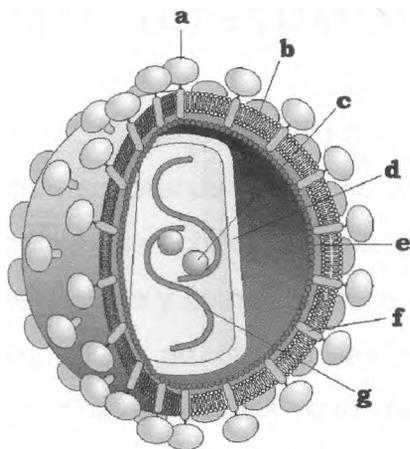
Los retrovirus son virus envueltos, de cadena sencilla de ARN positiva. Portan una enzima única, la transcriptasa reversa (TR), que convierte su genoma de ARN a un provirus de ADN, el cual es integrado en el genoma celular. En la Figura 1 se puede ver que la envoltura viral es una bicapa lipídica, producida por la membrana plasmática celular y contiene protuberancias de glicoproteínas virales Env. El núcleo (core) de la partícula viral, esta compuesto de la proteína de la cápside p24 (CA) y contiene el ARN viral y las enzimas. Todos los retrovirus tienen tres regiones codificantes en común: *gag*, *pol* y *env*, las cuales codifican proteínas de la cápside (Gag), las enzimas virales necesarias para la replicación (Pol) y las glicoproteínas externas (Env) que brotan de la envoltura viral, y son responsables de la infectividad de la partícula viral, por la vía de unión a receptores celulares específicos (Figura 2). Las enzimas virales codificadas por *pol* son la TR, la integrasa (IN) y la proteasa (PR). Los retrovirus tienen un sitio promotor y un sitio de poliadenilación en los LTR's (*long terminal repeats*). Una excepción a esta regla ha sido recientemente reportado ya que se detectó un promotor interno en los espumaretrovirus (Lochelt y cols, 1993; Campbell y cols, 1994; Lochelt y cols, 1995). La localización de la señal de poliadenilación y su sitio

procesado, parecen seguir una poliadenilación eficiente sólo en el extremo 3' del LTR. En algunos retrovirus, esto es reemplazado por la localización de una señal de poliadenilación AAUAAA dentro de la región U3, mientras en otros, una estructura secundaria específica es responsable de la formación de un sitio de poliadenilación eficiente. En VIH-1, se han propuesto los elementos de la región U3 y U5 como los responsables de la poliadenilación en el extremo 3' del LTR (Bohnlein y cols, 1989; Brown y cols, 1991; Valsamakis y cols, 1991; DeZazzo y cols, 1992). La producción de muchas proteínas de un transcrito primario sencillo requiere de diferentes estrategias por parte de los retrovirus:

- (a) la generación y procesamiento proteolítico de poliproteínas precursoras,
- (b) supresión del terminador de la traducción,
- (c) un *splicing* alternativo del transcrito primario, y
- (d) RNAm's bicistrónicos productores de dos proteínas.

Las proteínas adicionales expresadas por el VIH-1 son cada una para:

- 1) formar parte de la partícula viral (Vif, Vpr, Vpx),
- 2) regulación directa de la expresión de genes virales (Tat y Rev), o para interactuar con la maquinaria celular y promover la propagación del virus (Vpu y Nef).



© 2001 Garland Publishing

Figura 1. Estructura del VIH-1. Se puede observar de afuera hacia adentro: a) proteína de superficie gp120, b) bicapa de fofolpidos, c) enzima transcriptasa reversa, d) cápside, e) matriz, f) proteína transmembranal gp41, g) 2 cadenas de ARN cadena (-).

Las proteínas adicionales incrementan la complejidad de la organización y la expresión del VIH-1 y de otros lentivirus. Por esto se ha propuesto que los lentivirus sean incluidos en un subgrupo de retrovirus llamados retrovirus complejos, junto con el virus HTLV en la familia de los oncoretrovirus de primates (Cullen, 1991; Myers y Pavlakis, 1992). Las características distintivas de los retrovirus complejos es su habilidad para regular su propia expresión por la vía de factores proteínicos codificados por virus. Esta propiedad se ha propuesto como esencial para la asociación de largo término de los retrovirus complejos con el huésped y la generación de infecciones activas crónicas.

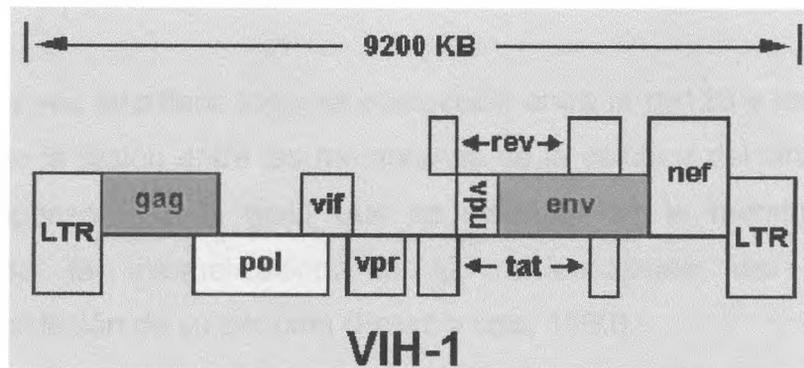


Figura 2. Distribución del genoma del VIH-1.

formación de la primera cadena del ADN, usando el ARN como molde (Essex y cols, 1997).

La síntesis de la segunda cadena complementaria del ADN requiere la acción de la ribonucleasa H. La doble cadena así generada, es integrada por medio de la integrasa viral en el genoma de la célula, aunque parte del ADN formado puede persistir en el citoplasma de la célula sin integrarse, dentro del genoma celular (Essex y cols, 1997). Se cree que en los linfocitos, este ADN no integrado podría producirse por la entrada de múltiples viriones en la célula. También se sabe que la copia del material genético del VIH como ADN se almacena en el citoplasma de la célula (latencia preintegración) y se va integrando en los cromosomas de la célula a medida que pasa el tiempo, o bien como consecuencia de estímulos sobre la célula. La integración del ADN proviral en el genoma celular puede depender del estado de activación de la célula.

El proceso de retro-transcripción y de integración no sólo dependen de los factores del VIH, ya que en ellos juega un papel importante la propia activación celular. Una vez integrado en el material genético de la célula, el provirus puede permanecer latente o empezar un proceso de replicación de una forma limitada o masiva, en cuyo caso se ocasionarán efectos citopáticos sobre la célula; mientras que en la latencia, producida tras la integración del provirus, no se producen alteraciones patológicas.

Diversos factores, tales como la exposición a antígenos, mitógenos, citoquinas o virus heterólogos, pueden activar la célula y producir una cascada de fenómenos que inducen la expresión del genoma viral. Estos factores, entre los que el factor activador de la transcripción de la síntesis de inmunoglobulinas, llamado factor nuclear kB (NFkB), es el principal factor regulador que induce el proceso de transcripción del VIH a partir de su estado de latencia, llevan a una nueva transcripción que supone la síntesis de ARNm

del virus a partir del ADN proviral integrado en la célula. Este ARN se sintetiza como un único transcrito que debe ser transportado al citoplasma de la célula, para procesarse en transcritos separados de diversos tamaños y en los que son de fundamental importancia las proteínas Tat y Rev (Essex y cols, 1997).

Se piensa que el resto de acontecimientos requieren señales específicas, sin las cuales sólo se forman partículas virales inmaduras sin ARN viral. El ensamblaje del *core* ocurre en la membrana celular y parece comenzar con la asociación de la proteína p17 de la matriz, con el dominio citoplasmático de la proteína gp41. También parece que el clivaje de las proteínas del *core* se produce a partir de poliproteínas precursoras durante la formación de la partícula y después de ella. La síntesis de las proteínas de la envoltura viral se producen en el retículo endoplásmico de la célula huésped a partir de la gp160; ésta, en el aparato de Golgi, es escindida por una proteasa para producir gp120 y gp41, antes de trasportarlas a la superficie de la célula (Essex y cols, 1997).

La estructura del virion maduro, incluye una membrana que sostiene las proteínas virales gp120 y gp41, además de varias proteínas celulares, un área central (*core*) que contiene ARN viral, TR e IN. Otras proteínas no son empaquetadas en los viriones y sólo toman parte en los pasos que preceden a la liberación de los virus. El esquema general del ciclo se puede seguir en la Figura 3.

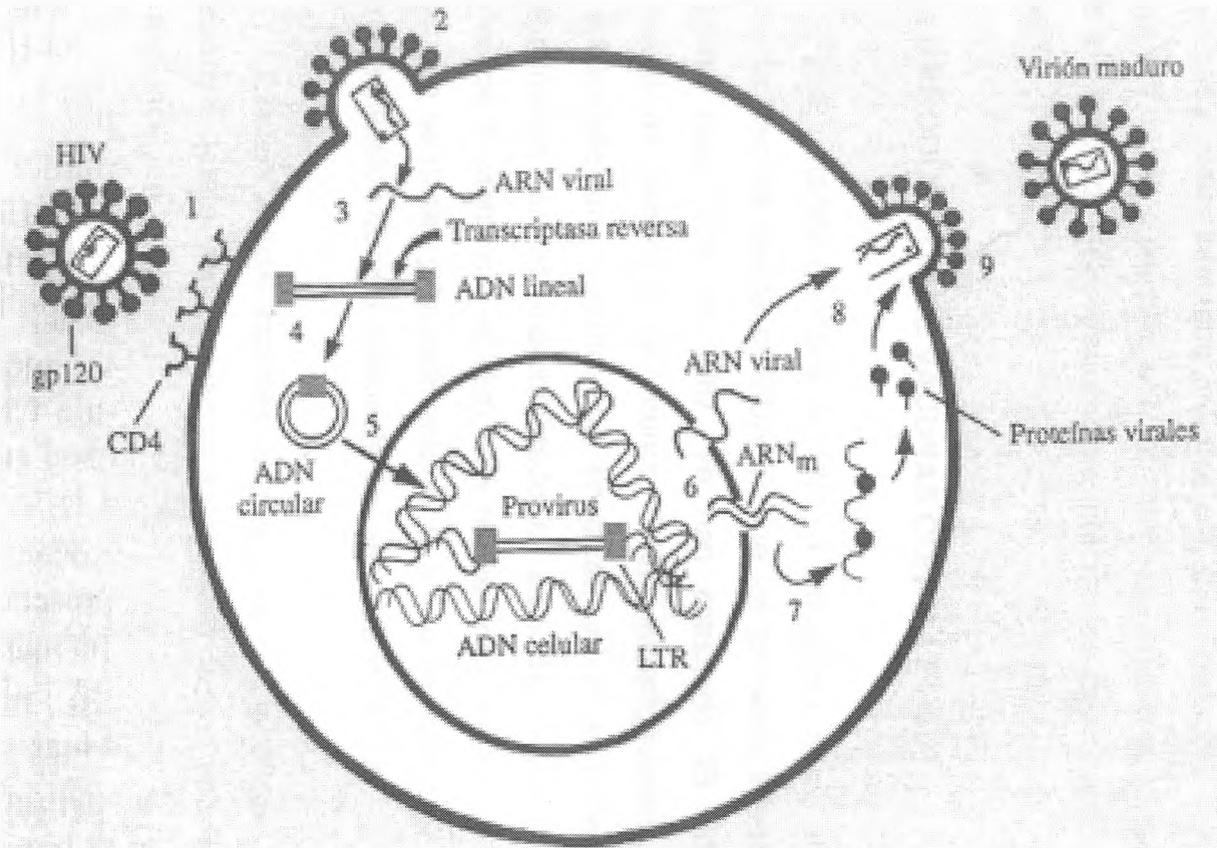


Figura 3. Ciclo replicativo del VIH-1.

Se piensa que la vida libre de los viriones es muy corta, aproximadamente de ocho a 12 horas, y que en 62 horas se realiza un ciclo viral completo, con salida desde la célula infectada, vida libre, entrada a otra célula, replicación intracelular y salida de viriones maduros. Se ha calculado que cada célula infectada produce del orden de 10^4 a 10^5 partículas virales, muchas de las cuales no son defectuosas, estimándose que un 1% del total de los linfocitos del organismo se infectan *de novo* cada día (Essex y cols, 1997).

3.1.5 PRODUCCIÓN DE VACUNAS CONTRA EL VIH

La variación genética del VIH ha dificultado, hasta ahora, el desarrollo de una vacuna contra el SIDA. Desde los primeros intentos por crear una vacuna para VIH en 1987, se han estudiado 28 diferentes vacunas preventivas alrededor del mundo. Estas investigaciones han progresado, enfocándose en proteínas de envoltura y en el papel de anticuerpos. Actualmente, se ha incrementado la atención en la importancia de los linfocitos T citotóxicos (CTLs). Las nuevas estrategias en la elaboración de vacunas se basan principalmente en la producción de anticuerpos anti-VIH y en la activación de una respuesta por parte de los CTLs.

Existen varias razones estratégicas y científicas que apoyan los esfuerzos para el descubrimiento y desarrollo de una vacuna para el VIH, las cuales incluyen:

- a) la inmunización, la cual es un método bien establecido de prevención contra enfermedades virales,
- b) la transferencia pasiva de anticuerpos antiVIH o antiSIV a chimpancés o monos ha sido capaz de prevenir la infección bajo ciertas condiciones,

- c) algunas vacunas contra el VIH y retrovirus relacionados han protegido en contra del VIH en ciertos modelos animales,
- d) a la fecha se sabe que varios candidatos de vacunas contra el VIH han sido seguros e inmunogénicos en estudios con humanos, y
- e) se ha sugerido, mediante modelos bioestadísticos, que aún a una intervención preventiva parcialmente efectiva, podría tener un gran efecto en contra de esta epidemia (Gellin, 1998).

Con los resultados recientes de avances científicos, muchos de los obstáculos para el desarrollo de vacunas no son tan importantes como se pensaba anteriormente. Por ejemplo, por mucho tiempo se había temido que la variación del VIH entre las poblaciones e individuos, permitiría al virus evadirse de respuestas de anticuerpos y de los CTL's, que pudieran ser esenciales para la protección en contra del virus de inmunodeficiencia humana (VIH/SIDA) (Hu y cols, 1986). Estudios recientes sobre los receptores del VIH han revelado la presencia de varios co-receptores, que incluyen al CCR5 y al CXCR4, los cuales son utilizados por el VIH, y que eventualmente podrían formar la base para el desarrollo de vacunas, las cuales pudieran inducir anticuerpos para la neutralización de un amplio rango de cepas de VIH. Además, con nueva metodología se ha visto que los CTLs aislados de enfermos del SIDA con un subtipo de VIH específico, pueden reconocer células representativas de otros subtipos y de otras regiones geográficas (Race y cols, 1995).

Los CTLs de individuos vacunados, usualmente pueden reconocer diferentes variantes genéticas de VIH. Esto sugiere que si los CTLs (u otras células T con actividad antiviral) son críticos para el control o la erradicación de infecciones por VIH, una vacuna podría inmunizar a una población diversa contra muchas cepas diferentes de VIH.

Entre las estrategias de vacunas experimentales contra VIH se encuentran las siguientes:

- Vacuna de subunidades: una parte de la superficie de VIH, como gp120 o gp160, producida por ingeniería genética.
- Vacuna a través de un vector activo: un virus como vaccinia modificado de manera que no produzca la enfermedad, pero capaz de transportar uno o varios genes que produzcan una o más proteínas del VIH.
- Combinación de vacunas: usando un vector recombinante para inducir la respuesta inmune celular seguida por la inyección de subunidades para estimular la producción de anticuerpos.
- Vacuna de péptidos: fragmentos de proteínas conocidas (péptidos) del VIH sintetizados químicamente para estimular la respuesta inmune específica al VIH.
- Vacuna de pseudovirión: un VIH no infeccioso que tiene una ó más, pero no todas, las proteínas del VIH.
- Vacuna de virus atenuado: en donde el VIH ha sido inactivado por métodos químicos, irradiación o algún otro medio de manera que éste no sea infeccioso.
- Vacuna de virus inactivados: en donde al VIH activo se le ha quitado uno ó más de sus genes reguladores.
- Vacuna de DNA: es la inyección directa de genes codificantes de proteínas del VIH.

Los CTLs son invariablemente inducidos por MHC I a través de la presentación de los epítopes de las proteínas codificadas por los genes transferidos, lo que da lugar al reconocimiento de células viralmente infectadas y su posterior destrucción (Davis y cols, 1995). La estrategia de este tipo de vacunación profiláctica es inducir la respuesta inmune humoral frente a la envoltura del virus y bloquear su entrada a las células, esto permitiría disminuir la infección viral ó evitar que el virus se disperse por todo el organismo. El gen de la glicoproteína de envoltura puede ser aislado de un genoma viral, clonarse y expresarse en un vector adecuado para su aislamiento (Michel y cols, 1995).

3.2 BACULOVIRUS SILVESTRE

El genoma de los baculovirus es relativamente grande (80,000-230,000 pb), es doble cadena circular y superenrollado (Miller, 1996). El nombre de baculovirus proviene de su forma de bastón o barra, tienen un diámetro de 40-50 nm y 200-400 nm de largo. La familia Baculoviridae incluye dos géneros de virus líticos, los Granulovirus (GNV) y los Nucleopoliedrovirus (NPV) (Volkman y cols, 1995). Los GNV se caracterizan por tener sólo un virión ocluido dentro de una matriz proteica de granulina; ésta matriz es un cristal ovicilíndrico. Los NPV se caracterizan por la presencia de múltiples viriones embebidos en cuerpos de oclusión, formados en el núcleo de las células infectadas. Los cuerpos de oclusión están formados de una matriz cristalina poliédrica compuesta de una proteína de 29 k-Da conocida como poliedrina. Dentro de los NPV, éstos se dividen en múltiples cuando hay dos o más ADN por virión (MNPV), o sencillos (SNPV) si es solo un ADN por virión. Al menos se han identificado cerca de 498 NPV y de 135 GNV (Volkman y cols, 1995).

Los baculovirus son usualmente patógenos de artrópodos, particularmente de insectos holometábolos de los ordenes Lepidóptera, Díptera, Hemíptera, Himenóptera, Coleóptera y crustáceos Decápodos.

Asimismo, sólo pueden infectar a unas pocas especies estrechamente relacionadas dentro de un género o familia, siendo los estadíos larvales los más susceptibles (Miller, 1996; Vaughn, 1999). Por ejemplo, el NPV de *Bombix mori* (*BmNPV*) tiene un rango limitado de hospedero a células de *Bombix mori*. Por otra parte, el NPV de *Autographa californica* (*AcNPV*) puede replicarse en cerca de 30 líneas celulares aisladas de diferentes especies de lepidópteros (Luckow, 1991; Vialard y cols, 1995). Por lo cual, es por mucho el NPV más utilizado para la producción de proteínas heterólogas, aunque otros como el de *BmNPV* o *TnNPV* también se emplean. Otra ventaja para el *AcNPV* es que ya se conoce completamente su secuencia genómica (Ayres y cols, 1994).

3.2.1 CICLO REPLICATIVO DEL BACULOVIRUS SILVESTRE

El ciclo replicativo típico de los baculovirus se divide en cuatro etapas, dependiendo la expresión de genes: inmediatamente temprana (α), temprana tardía (β), tardía (γ) y muy tardía (δ) (Granados, 1980; Blissard y Rohrmann, 1990; Luckow, 1991; O'Reilly y cols, 1994). Después de ser consumidos por el insecto los viriones ocluidos, la matriz proteica de poliedrina es disuelta, y los viriones son liberados y absorbidos por las células epiteliales intestinales (Granados, 1980; Blissard y Rohrmann, 1990). A partir de este momento, inicia la fase α del ciclo infeccioso. Durante esta fase los genes virales son transcritos y traducidos, utilizando los factores de replicación del huésped. Durante la fase β ocurre el reordenamiento del citoesqueleto y núcleo, la cual se caracteriza por la degradación del genoma del hospedero. En la fase γ inicia la replicación del DNA viral, el ensamblaje de la nucleocápside y la infección secundaria. Por último, la fase muy tardía de infección (δ) inicia con la transcripción de la poliedrina y el de la proteína p10. Los virus en ensamblaje cesan su movimiento y se inicia la acumulación de viriones en el núcleo, donde son ocluidos en la matriz de poliedrina.

3.3 SISTEMAS DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

La expresión de genes heterólogos (recombinantes) es de gran interés para la producción de proteínas con importancia farmacéutica por el uso terapéutico o comercial, como es el caso de muchas enzimas (Domínguez y cols, 1998) Para lograr esto, la tecnología de ADN recombinante ha jugado un papel fundamental para el desarrollo de la biotecnología de proteínas, ya que gracias a ésta, ha sido posible producir proteínas difíciles de obtener por métodos tradicionales, ya sea por la dificultad de ser aisladas en cantidad o porque son proteínas rediseñadas que no se encuentran en la naturaleza (Escamilla-Treviño, 1999).

En sus principios, para la producción de proteínas recombinantes se empleó la bacteria *Escherichia coli*. El dominio de *E. coli* sólo se consideró como un reflejo del conocimiento e información acerca de los sistemas genéticos y bioquímicos acumulados por varias décadas de investigación. Sin embargo, como la naturaleza de las proteínas recombinantes expresadas se volvió más compleja y como los sistemas de transformación fueron establecidos en cada vez más especies, se desarrolló una gran variedad de hospederos; entre ellos, cabe mencionar muchos procariotes, hongos, levaduras, cultivo de células de insecto y de mamíferos, hasta plantas y animales transgénicos (Domínguez y cols, 1998; Escamilla-Treviño, 1999).

3.3.1 Sistema de Expresión en Bacterias: *Escherichia coli*

La bacteria *E. coli*, ha sido considerada la opción perfecta por múltiples razones. Es un organismo unicelular que se reproduce principalmente por vía asexual. La simplicidad del microorganismo hace que sea fácil y barato el trabajarlo. Su fuente de alimentación es simple y no requiere factores especiales para su crecimiento y mantenimiento. Tiene un ciclo de crecimiento rápido que permite un incremento rápido en el tamaño de la población,

duplicando su población en una hora. Puede contener los plásmidos, que pueden ser fácilmente aislados y manipulados.

Al ser un procarionte, carece de organelos; esto le confiere desventajas en la producción de proteínas recombinantes, ya que en los organelos es donde ocurren las modificaciones postraduccionales de las proteínas, las cuales son en la mayoría de los casos, las que le confieren la forma funcional protéica. La proteína recombinante es conservada dentro de la bacteria en vacuolas llamadas cuerpos de inclusión, los cuales llegan a ser tóxicos para las células, dada la cantidad de proteína acumulada generando la degradación de la misma por acción de las proteasas. Una desventaja mayor presentan los procariotes, ya que con el tiempo, no conservan la información genética transferida en vectores plasmídicos para expresar las proteínas; por lo tanto, requieren que la información genética sea estable al incorporarla al ADN bacteriano, resultando muchas veces en el apagado de genes estructurales (Dong y Kurland, 1996).

3.3.2 Sistema de Expresión de Eucariotes: Levaduras

Dentro de las levaduras, *Pichia pastoris* es considerada como la más importante en sistemas de expresión de proteínas recombinantes. *P. pastoris* es una levadura industrial metilotrófica, se caracteriza por tener la capacidad de crecer a una muy alta concentración celular en medios simples. Se pueden obtener grandes cantidades de proteína intracelular, tiene una alta capacidad de secreción de proteínas en medios libre de proteínas, los procesos de fermentación son sencillos a alta densidad celular, es genéticamente estable y los procesos pueden ser fácilmente escalables sin pérdidas en la producción de proteína (Romanos, 1995).

Probablemente, el problema más común es la proteólisis de los péptidos secretados, así como la secreción deficiente de proteínas complejas, dado que la secreción de proteínas recombinantes es más demandante en

comparación con la expresión intracelular. Se ha observado, asimismo, que algunos genes no producen una proteína detectable, muchas de las veces a causa de que los terminadores de la transcripción en las levaduras resultan en un ARNmensajero trunco. Sin embargo, tal vez el mayor problema es el sistema de activación dependiente de metanol, que no permite el cultivo continuo seguro por la inestabilidad provocada por el alcohol (Romanos, 1995).

3.3.3 Sistema de Expresión de Eucariotes: Células de Mamífero en Cultivo

Ha sido difícil de llevarse a cabo la expresión regulada de proteínas recombinantes de interés en células de mamíferos, pero es vital cuando la proteína estudiada es potencialmente tóxica para la célula huésped. Sólo la complejidad que compone las células de mamífero tan especializadas, puede pensarse que garantiza los procesos de plegamiento y configuración tridimensional de las proteínas recombinantes; sin embargo, este hecho no resulta como buena garantía. Uno de los mayores retos al utilizar sistemas de expresión de mamíferos son los costos generados, ya que deben garantizar el aporte de CO₂, medios adicionados con antibióticos, medios enriquecidos con suero fetal bovino, y a pesar de todo lo anterior, se mantiene el riesgo de que la proteína de interés producida esté acompañada de pirógenos nocivos al humano. En general, se reconocen tres diferentes sistemas de expresión inducibles en células de mamífero: el sistema inducible por *Lac*, el sistema de expresión regulado por tetraciclina y el sistema inducible por ecdisona.

Una de las mayores ventajas del sistema inducible por *Lac*, es el estar basado en el operón *lac*, un operón regulatorio bacterial bien caracterizado. El inductor sintético es el IPTG, no es tóxico y es transportado rápidamente dentro de la célula eucariótica, permitiendo que el tiempo de inducción sea muy corto, de 4 a 12 h. Una de las desventajas del sistema es que no se logra un buen plegamiento de la proteína de interés debido a los altos niveles

básales de expresión, otra desventaja es que son limitados los vectores disponibles para insertar genes de interés ya que solo hay dos vectores.

El sistema de expresión regulado por tetraciclina está basado en el operón bacterial *tet* que es bien conocido, la inducción o represión del sistema requiere tetraciclina a dosis bajas no tóxicas y fácilmente transportables al interior de la célula. Asimismo, se pueden generar ratones transgénicos con éste sistema. Sin embargo, en este sistema se han detectado altos niveles basales de proteínas recombinantes, y ha sido difícil generar clonas estables.

El sistema inducible por ecdisona está basado en la vía de muda del insecto *Drosophila*, como la regulación es muy fuerte no se observan niveles basales de expresión. La inducción es fuerte por un análogo de la hormona esteroidea ecdisona, se pueden regular los niveles de expresión y el plegamiento de la proteína es muy similar a la silvestre. Las desventajas del sistema son el que es un sistema de selección dual, al requerir dos vectores para generar las clonas estables, y el ser un sistema relativamente nuevo, por lo tanto, se desconocen muchas de sus utilidades (Russell, 1998).

3.3.4 Sistema de Expresión de Eucariotes: Células de Insecto-Vectores de Expresión Baculovirales

Los cultivos de células animales han ganado una posición suprema en la biotecnología moderna, como evidencian el amplio mercado emergente y las importantes aplicaciones terapéuticas, profilácticas y diagnósticas que tiene las proteínas producidas por esta tecnología. De hecho, al menos se reconocen a la fecha 16 proteínas recombinantes derivadas de cultivos celulares, las cuales son cerca de la mitad de las producidas por tecnología de ADN recombinante aprobadas a la fecha para su aplicación en el mercado libre (Palomares y cols, 2001). Asimismo, cerca de 100 proteínas producidas de cultivos de células animales se encuentran en etapa de estudio clínico, y

se espera que más de la mitad de las nuevas proteínas terapéuticas requieran células animales para su producción. La expresión de genes en células animales se requiere dado que la actividad *in vivo* de muchas proteínas recombinantes depende en gran medida de las complejas modificaciones postraduccionales, las cuales sólo pueden ser llevadas a cabo por células eucarióticas superiores (Gooche y cols, 1991). Las células de mamíferos son preferidas para aplicaciones humanas, debido a que las modificaciones postraduccionales son muy parecidas a las observadas en las proteínas humanas. Las tecnologías de cultivo de células de mamíferos han evolucionado de forma importante en los últimos 20 años. Sin embargo, aun presentan varios retos importantes, como pueden ser la selección, transfección y la ampliación de líneas celulares estables y con alta producción, lo cual es laborioso y consume tiempo. Más allá, las concentraciones y producción son en general bajas, mientras que todos los costos del bioproceso suelen ser tan altos como al de otros sistemas de expresión, como los de procariotes, eucariotes menores, y plantas y animales transgénicos. Debido a todo lo anterior, existe un reto permanente en mejorar los sistemas de expresión con las ventajas de los cultivos de células de mamíferos, pero sin sus desventajas. Entre las diversas opciones, el sistema células de insecto-vectores de expresión de baculovirus (IC-BEVS por sus siglas en inglés) representa una alternativa muy prometedora.

La producción de proteínas heterólogas por el IC-BEVS consiste en dos etapas, donde primero las células de insecto crecen a una concentración deseada y entonces son infectadas con el baculovirus recombinante que contiene el gene que codifica para la proteína de interés. El origen del cultivo de células de insecto inició en los primeros años de 1960, cuando fue establecida la primera línea celular de insecto (Grace, 1962). Los primeros baculovirus al principio fueron propagados en células de insecto (*in vivo*) con el propósito de producir bioinsecticidas. En los años 1950's, se llevaron a cabo extenuantes pruebas sobre la bioseguridad del uso de baculovirus como

bioinsecticida, siendo en 1975 cuando la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) registró el primer baculovirus para tal uso (Chakraborty, 1995; Maeda, 1995; Teakle, 1995; Wood, 1995; Miller, 1996), siendo hasta el año de 1983 cuando se logró por primera vez construir el primer baculovirus recombinante, destacando el trabajo de Smith y cols. (1983) quienes realizaron cambios estructurales al gen de la poliedrina para lograr producir la proteína β -Interferón (Smith y cols, 1983), logrando con tal tecnología abrir un nuevo campo de investigación y desarrollo. De tal forma que el interés inicial en la producción de bioinsecticidas se expandió, incluyendo el mejoramiento de éstos y el de nuevas aplicaciones, de manera particular en el área médica y farmacéutica. A la fecha, los baculovirus genéticamente modificados han resultado como potentes vectores para expresar proteínas heterólogas en células de insecto, en condiciones *in vivo* e *in vitro*. Asimismo, en investigaciones recientes ha quedado demostrado que los baculovirus recombinantes pueden expresar los genes heterólogos en hepatocitos humanos (Hofrann y cols, 1995). Esta aplicación ha dejado al descubierto una nueva línea de estudio para los vectores baculovirales como terapia génica; sin embargo, también se cuestiona el riesgo potencial que puede ser el uso de estos organismos recombinantes en agricultura (Hofrann y cols, 1995; Richards y cols, 1998).

Al ser comparado con otros sistemas de expresión, el IC-BEVS presenta importantes ventajas, entre ellas la velocidad de cultivo y cosecha, la simplicidad del bioproceso, la poca reactividad, versatilidad, el alto nivel de expresión y la capacidad de llevar a cabo procesos postraduccionales, entre otras ventajas (Ver Tabla 2).

Tabla 2. Características relevantes del IC-BEVS

<p>Seguridad</p> <ul style="list-style-type: none"> • Rango de infectividad restringido a artropodos. • Las células de insecto no se consideran transformantes, por lo tanto el riesgo de transmisión de componentes promotores del cáncer es reducido. • Hay muy baja probabilidad de que las células de insecto contengan virus peligrosos para el humano u otros mamíferos.
<p>Rapidez, simplicidad y confiabilidad</p> <ul style="list-style-type: none"> • La construcción de un baculovirus recombinante confiable es simple y rápida. • No se requiere transfecciones de líneas celulares, selección o screening sucesivos. • Se requieren periodos cortos de tiempo para obtener cantidades substanciales de la proteína heteróloga.
<p>Versatilidad</p> <ul style="list-style-type: none"> • Se han producido 500 diferentes proteínas recombinantes funcionales. • Permite el empaquetamiento y expresión de genes de gran tamaño. • Se pueden producir proteínas multiméricas, o sea, puede expresar varias proteínas clonadas simultáneamente. • Puede distinguir splicing en intrones/exones, así, puede expresar genes sin splicing. • La proteína heteróloga puede ser transportada a su localización celular natural.
<p>Altos niveles de expresión</p> <ul style="list-style-type: none"> • La proteína heteróloga puede llegar a ser el 50% de la proteína total celular. • En comparación con sistemas de células de mamíferos, puede producir proteína heteróloga de 20 a 250 veces más. • La concentración más alta reportada de proteína heteróloga que pudo ser obtenida es de 500mg/L
<p>Modificaciones postraduccionales</p> <p>Las proteínas heterólogas pueden experimentar: N- y O-glicosilación, fosforilación, acilación de ácidos grasos, α-amidación, amidación N-terminal, carboximetilación, isoprenilación, folding, corte de péptido señal, corte de sitio proteolítico, aunque pueden existir algunas diferencias con la proteína silvestre.</p>
<p>Características convenientes para bioprocesos</p> <ul style="list-style-type: none"> • Las células de insecto fácilmente se adaptan a cultivos en suspensión. • El proceso puede ser fácilmente escalable. • El control de la expresión se puede llevar al manipular el tiempo y la multiplicidad de infección. • Se puede utilizar la fusión de proteínas para facilitar los procesos de purificación y/o monitoreo de la proteína. • Los promotores muy tardíos permiten la expresión en genes con productos citotóxicos recombinantes.

Como resultado de lo anterior, se han incrementado durante la última década las publicaciones científicas y las patentes sobre desarrollo de productos que se expresan con éste sistema (Luckow, 1991; Palomares y

Ramírez, 1998). No obstante, aún es necesario aprender y mejorar el sistema IC-BEVS. La generación de las modificaciones postraduccionales de las proteínas es indispensable si se desea dirigir el uso del sistema con fines terapéuticos.

3.3.4.1 LÍNEAS CELULARES DE INSECTOS

La línea celular más común es la derivada de los lepidópteros *Spodoptera frugiperda*, *Trichoplusia ni* y *Mamestra brassicae*. En particular, las clonas Sf9 y Sf21 obtenidas de *S. frugiperda* son las más utilizadas para la producción de proteínas recombinantes (O'Reilly y cols, 1994), aunque aún otras líneas celulares muestran un mejor potencial. La línea celular HighFive (Invitrogen, T-ni BTI-TN-5b1-4) ha demostrado un buen potencial, al obtenerse de ella una alta concentración de proteína heteróloga en comparación con Sf9.

3.3.4.2 BACULOVIRUS RECOMBINANTE

La matriz de poliedrina es indispensable para la sobrevivencia del NPV en medio natural, pero esta no es requerida en cultivos celulares de insecto. De esta manera, un gene de interés puede ser colocado en el lugar del gene de la poliedrina (*polh*); así, el control de su expresión será por el promotor fuerte de la *polh*; sin decrementar el ciclo replicativo del virus desnudo. Al llevar a cabo la infección de células de insecto con cualquier baculovirus recombinante, se obtienen grandes cantidades de proteína recombinante, debido a que el promotor *polh* es muy fuerte. Los primeros en iniciar esta estrategia fueron los del grupo de Smith y cols (1983), aplicada a la producción de interferón β -humano recombinante en células de insecto. A la fecha, son más los genes que han sido expresados en el sistema IC-BEVS y se exponen bajo el promotor de *polh*. Como el *polh* es sobreexpresado durante la fase de infección muy tardía, la proteína recombinante no es detectada en el cultivo hasta las 18 hpi, encontrando los picos de

concentración más altos entre las 48 y 120 hpi. El baculovirus recombinante sigue un ciclo de replicación similar al silvestre, con sus ligeras diferencias. A saber, los cultivos son directamente infectados con el virus desnudo y la progenie viral no se encuentra ocluida en la matriz de poliedrina cuando ha sido deletada; en este caso, la proteína recombinante será producida en lugar de la poliedrina y puede ocurrir una infección secundaria. En éste proceso, la progenie del virus infecta células que no fueron infectadas durante la infección primaria. Un baculovirus silvestre con el gen intacto de la poliedrina puede también ser propagado en cultivos celulares al producir virus ocluidos (Claus y cols, 1993; Visnovsky y Claus, 1994). El proceso de infección *in vitro* puede ser observado por varios métodos, siendo los más comunes el uso de anticuerpos contra células *Sf9* infectadas (Mariani y Krammer, 1997), el ensayo de agar en placa para determinar el número de partículas infecciosas presentes en la muestra, o la amplificación de secuencias conservadas de poliedrina usando técnicas basadas en la PCR (O'Relly, 1994; De Moraes y Maruniak, 1997).

Al igual que con el gen de la poliedrina, hay genes heterólogos que han sido clonados bajo el control de otros promotores fuertes, como el *p10*, el cual permite una construcción e identificación del vector sencillo (Vlak y cols, 1988; Williams y cols, 1989; O'Relly, 1994). Se han reportado algunas ventajas que da el uso del promotor de *p10*, como lo es la facilidad de clonar dos copias de los genes heterólogos bajo la regulación de los promotores *p10* y *polh* (DiFalco y cols, 1997), de tal forma se obtiene una alta concentración de proteína recombinante, que sólo cuando se usa cada promotor por separado.

3.3.4.3 PRODUCCION DE VACUNA CONTRA EL VIH UTILIZANDO UN SISTEMA DE EXPRESION DE BACULOVIRUS

Específicamente, la región que se está empleando para la producción de vacunas contra el SIDA en sistemas con baculovirus es el precursor de la glicoproteína recombinante (rgp) 160 del VIH, el cual, al ser escindido, da lugar a las glicoproteínas gp120 y gp41. Al parecer, debido a su alta variabilidad para inducir la respuesta contra el VIH, la gp120 es la subunidad idónea para actuar como inmunógeno del VIH (Ver Tabla 3).

Los costos de IC-BEVS para la elaboración de productos clínico-farmacéuticos, como vacunas para virus de boca y pies, interferón y anticuerpos monoclonales, no son excesivos (Luckow y Summers, 1988).

La expresión de genes estructurales del VIH en el sistema IC-BEVS comenzó a mediados de los años 90's. Un ejemplo es el uso de las secuencias codificantes de gag, pol, env y vif, todas ellas bajo el control del promotor de la poliedrina, donde se obtuvo un alto nivel de expresión de las proteínas (Kang, 1997).

Cuando se estudió la funcionalidad u obtención de gp120 activa al producirse en un sistema de baculovirus, entendiendo como la que cuenta con la capacidad de unirse al receptor CD4, se estableció que del 50% al 90% de la proteína es activa (Golden y cols, 1998).

Tabla 3. Sistemas de producción de baculovirus para la fabricación de vacunas que se encuentran en fase de investigación para tratamiento clínico¹

Enfermedad	Subunidad para la vacuna	Método de producción/ tipo de Baculovirus	Cepa o tipo del virus	Adyuvante o formulado	Estado de desarrollo
Hepatitis D	HDV	<i>In vitro</i> /normal	Hepatitis tipo D	ND	Básico
Virus de la influenza	HA	<i>In vitro</i> /normal	Influenza tipo HA	ND	Fase II
Virus de la influenza	Núcleo-Proteína	<i>In vitro</i> /normal	Influenza tipo HA	ND	Fase I
SIDA	rgp160	<i>In vitro</i> /normal	VIH cepa LAI	Alumina	Fase I-P Fase I-II-T
SIDA	rgp160	<i>In vitro</i> /normal	VIH cepa MN, Thai Clade E	Alumina	PPC-AP
SIDA	rgp160 oligomérico	<i>In vitro</i> /normal	VIH cepa LAI	Alumina/ MPL/IFA	PPC-AP,M
SIDA	rp24	<i>In vivo</i> /normal	VIH cepa LAI	alumina	Fase I-P Fase I-T
SIDA	V3-HA	<i>In vitro</i> / recombinante	VIH cepa MN	Hemaglutinina del virus de la influenza	PPC-AP
SIDA	Partículas tipo virales Gag-V3	<i>In vitro</i> /normal	VIH cepa LAI	ND	PPC-AP
SIDA	Partícula Gag P55	<i>In vitro</i> /normal	VIH cepa LAI	Alumina	Básico

¹Significado de claves:

VIH, virus de inmunodeficiencia humana

LAI, grupo de aislados muy relacionados al VIH, que incluye al LAV, IIIB, BH10 y BRU.

P, pruebas para la prevención y profilaxis

T, pruebas terapéuticas en voluntarios enfermos

PPC, pruebas preclínicas

AP, animales pequeños

M, monos

MPL/IFA, emulsiones microfluidizables de aceite en agua/ adyuvante incompleto de Freund.

Tomado de: The Jordan Report 98: Accelerated development of vaccines (Gellin, 1998)

La respuesta inmune humoral hacia gp120 del VIH-1 se comparó en ratones inmunizados con un plásmido o con una rgp120 producida en el sistema IC-BEVS, formulada con el adyuvante completo de Freund's. Para el primer caso, se observaron títulos virales de 10^4 y 10^5 , mientras que para la proteína derivada de baculovirus, fueron menores a 10^5 . El estudio estableció que la capacidad funcional como inmunógeno de la gp120 es dependiente de la forma de su presentación (Peet y cols, 1997).

Con el uso de tecnología de ADN recombinante, se han utilizado vectores de expresión baculovirales (Buonaguro y cols, 2001) para expresar partículas similares a las virales (VLP's). El proceso consiste en crear un baculovirus portando genes como *gag*, *gp120*, *nef* y *pol*, todos estos con diferentes marco abierto de lectura, todo lo anterior para tratar de evaluar la expresión en cantidad balanceada de múltiples epítopes y su empaquetamiento en estructuras VLP.

Recientemente, se ha desarrollado un candidato a vacuna de VIH-1 basado en VLP's que expresan una gp120 de Uganda subtipo A. Los experimentos *in vivo* se llevaron a cabo con ratones Balb/c con un régimen de inmunización múltiples sin uso de adyuvantes, mostrando una inducción significativa de inmunidad humoral y celular. La respuesta celular específica a Env fue evaluada *in vitro*, midiendo respuesta proliferativa de células T cooperadoras y por actividad citolítica de linfocitos T citotóxicos. Asimismo, el suero inmune mostró poco menos de 50% de actividad neutralizante contra

los aislados de células T autólogas y heterólogas pertenecientes al subtipo B (Buonaguro y cols, 2002).

Por todo lo anterior, nosotros creemos que es factible el desarrollo del sistema cultivo de células de insecto-vectores baculovirales, enfocándonos en el desarrollo de un baculovirus recombinante que exprese la gp120 del VIH-1 subtipo B en cultivo de células de insecto.

4. OBJETIVO GENERAL

Construcción de un baculovirus recombinante que exprese la proteína heteróloga gp120 del VIH-1 subtipo B, y su propagación *in vitro* en la línea celular de insectos Sf9.

5. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Obtención de la secuencia genómica de la proteína gp120 del VIH-1 subtipo B de pacientes mexicanos, mediante la técnica de PCR.
2. Construcción del baculovirus recombinante conteniendo la secuencia de la gp120 VIH-1 subtipo B.
3. Expresión, propagación y titulación *in vitro* del baculovirus recombinante con la gp120 del VIH-1 subtipo B en la línea celular de insectos Sf9.

6. HIPÓTESIS

Con el uso de tecnología de ADN recombinante se puede construir e implementar el sistema de expresión en cultivo de células de insecto -vector baculoviral, para construir un baculovirus que exprese la proteína gp120 del VIH-1 subtipo B, de una cepa de referencia y de un paciente mexicano.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

La estrategia experimental que se llevó a cabo en el presente trabajo se puede observar en el Diagrama de flujo 1, donde se mencionan y se agrega una clave a cada uno de los pasos a seguir.

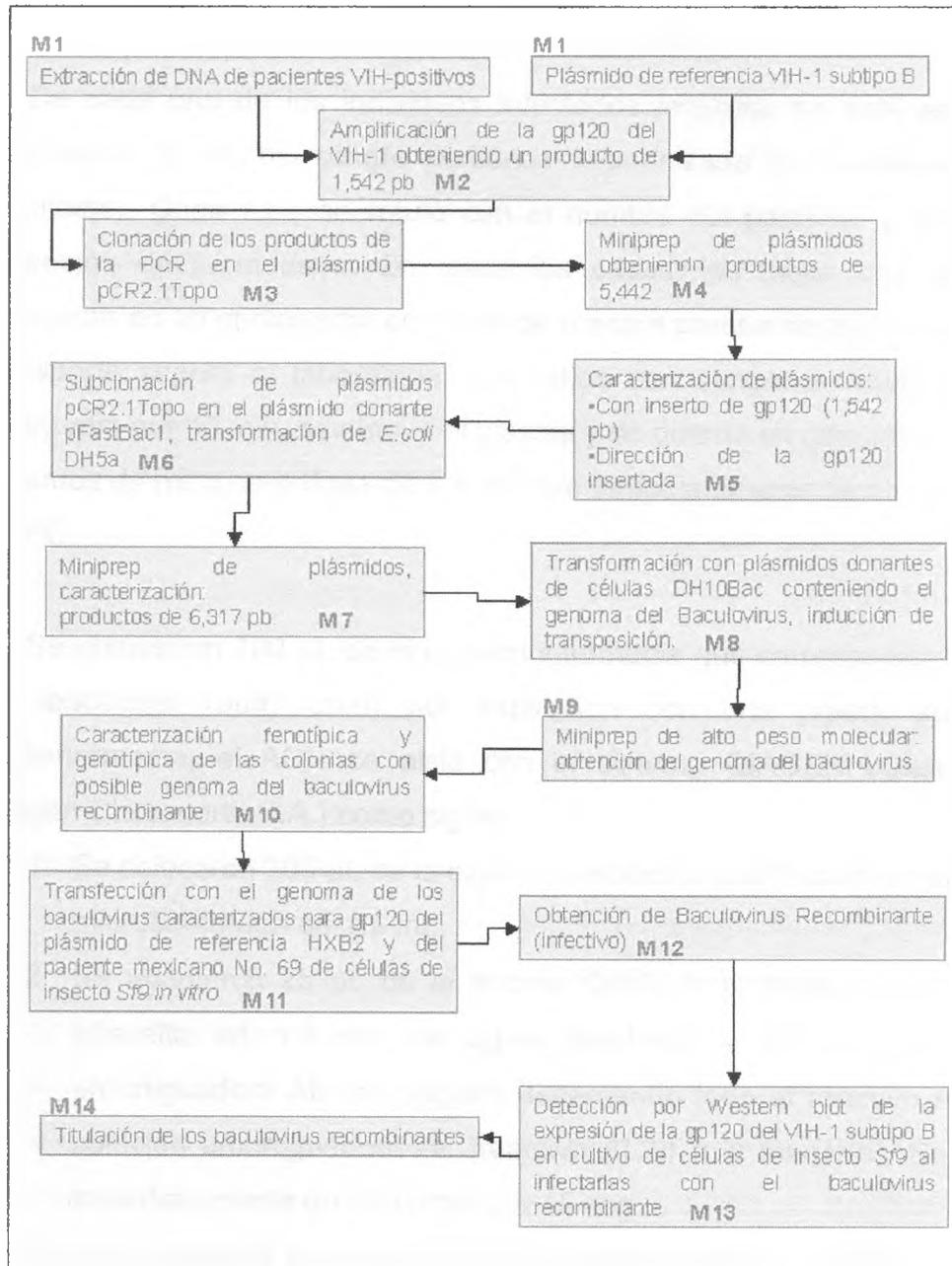


Diagrama de Flujo 1.- Estrategia experimental del proyecto. Se puede observar cada paso a seguir en éste trabajo, asimismo se proporcionó una clave para cada evento.

7.1 Obtención de muestras de individuos infectados por el VIH (M1).

Los individuos infectados con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH) se seleccionaron de manera aleatoria. Todos fueron seropositivos por ELISA y confirmados por la técnica de inmunoelectrotransferencia o Western Blot.

7.1.1 Obtención de ADN

De cada uno de los individuos infectados incluidos en este estudio, se obtuvieron 10 mL de sangre periférica heparinizada por venopunción con vacutainer. Cada tubo se rotuló con el nombre del paciente y la fecha de obtención de la muestra. En todos los casos, los tubos con sangre se colocaron en un contenedor con tapa de rosca a prueba de derrames, para el transporte seguro al laboratorio. Los tubos con sangre se centrifugaron a 4,400 rpm por 10 min, se obtuvo el plasma y se guardó en pequeñas alícuotas en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL que inmediatamente se almacenaron a -70°C .

Se obtuvieron 200 μL de la porción intermedia que corresponde a la capa de leucocitos (*buffy coat*) por aspiración con una pipeta automática; posteriormente, el ADN se aisló con el sistema QIAGEN (Qiamp blood, Qiagen Chatsworth, CA.) como sigue:

1. Se colocaron 200 μL de la capa de leucocitos (*buffy coat*) en un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL.
2. Se añadieron 25 μL de la enzima QIAGEN proteasa o proteinasa K (disuelta en 1.4 mL de agua destilada) y 200 μL de solución amortiguadora AL (se preparó decantando todo el reactivo AL1 en la solución amortiguadora AL [reactivo AL2]) a la muestra). Se agitaron inmediatamente en un *vortex* por 15 seg.
3. Cada muestra se incubó a 70°C por 10 minutos y posteriormente se añadieron 210 μL de etanol absoluto y se mezclaron en un *vortex*.

4. Se colocó en las columnas QIAMP el contenido de los tubos del paso anterior, se centrifugaron a 8,000 rpm por 1 min. El eluente se recuperó en los tubos de colección.
5. Se lavó cada columna QIAMP pasando por ella 500 μ L de la solución amortiguadora AW (se preparó este reactivo añadiendo 40 mL de etanol absoluto). Posteriormente, cada columna se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min. Nuevamente se descartó el eluente.
6. Se repitió el paso anterior con la diferencia de que se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min.
7. El ADN se eluyó de las columnas con 200 μ L de la solución amortiguadora AE (solución acuosa de tris/HCl) precalentado a 70°C. Se incubó la columna a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min.

Se determinó la concentración del ADN purificado por espectrofotometría, a una longitud de onda de 260 nm. La integridad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en la solución amortiguadora TBE y tinción con bromuro de etidio.

7.2 Obtención de la gp120 del VIH-1

7.2.1 Amplificación de las secuencias del VIH-1 por PCR (M2)

La detección molecular de la presencia de secuencias genómicas del VIH-1 se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), específicamente mediante un PCR en nido (nested), con la enzima Platinum[®] Taq PCR_x DNA polymerase, que es un complejo de Taq ADN polimerasa recombinante unida a un anticuerpo que inhibe la actividad polimerasa de ésta. En general, esta enzima contiene un aviso de inicio de actividad dado por el anticuerpo unido a ella, el cual, al llegar a una temperatura determinada (94°C) se desnaturaliza y por consecuencia libera

4. Se colocó en las columnas QIAMP el contenido de los tubos del paso anterior, se centrifugaron a 8,000 rpm por 1 min. El eluente se recuperó en los tubos de colección.
5. Se lavó cada columna QIAMP pasando por ella 500 μ L de la solución amortiguadora AW (se preparó este reactivo añadiendo 40 mL de etanol absoluto). Posteriormente, cada columna se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min. Nuevamente se descartó el eluente.
6. Se repitió el paso anterior con la diferencia de que se centrifugó a 14,000 rpm por 3 min.
7. El ADN se eluyó de las columnas con 200 μ L de la solución amortiguadora AE (solución acuosa de tris/HCl) precalentado a 70°C. Se incubó la columna a temperatura ambiente por 1 min y se centrifugó a 8,000 rpm por 1 min.

Se determinó la concentración del ADN purificado por espectrofotometría, a una longitud de onda de 260 nm. La integridad del ADN se verificó por electroforesis en gel de agarosa al 1% en la solución amortiguadora TBE y tinción con bromuro de etidio.

7.2 Obtención de la gp120 del VIH-1

7.2.1 Amplificación de las secuencias del VIH-1 por PCR (M2)

La detección molecular de la presencia de secuencias genómicas del VIH-1 se realizó mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), específicamente mediante un PCR en nido (nested), con la enzima Platinum[®] Taq PCR_x DNA polymerase, que es un complejo de Taq ADN polimerasa recombinante unida a un anticuerpo que inhibe la actividad polimerasa de ésta. En general, esta enzima contiene un aviso de inicio de actividad dado por el anticuerpo unido a ella, el cual, al llegar a una temperatura determinada (94°C) se desnaturaliza y por consecuencia libera

los sitios activos de la enzima, iniciando la actividad polimerasa; gracias a esto se elimina o reducen las amplificaciones inespecíficas durante la PCR en el ciclo de temperatura inicial (Chou y cols, 1992; Sharkey y cols, 1994; Westfall y cols, 1997). La marcada diferencia con que cuenta esta enzima con referencia a otras existentes en el mercado, es la solución amortiguadora de reacción empleada, cuenta con una solución potenciadora que simplifica la amplificación de templados ricos en G-C, que bajo condiciones normales resulta difícil llevar a cabo la reacción.

La técnica de PCR en nido (nested) se utilizó para amplificar una región de 2000 pb del gene *env* de VIH; de esta manera se incrementó la especificidad de la reacción de amplificación. El procedimiento involucra dos reacciones de PCR, usando un par de *primers* diferentes en cada reacción. En la primera reacción de PCR, el producto obtenido con el primer par de oligonucleótidos sirve como templado para la segunda reacción de PCR. En la segunda reacción, se usa otro par de oligonucleótidos que hibridan en una secuencia interna del producto obtenido en la primera reacción. Usando este procedimiento, el producto que se amplifica es seleccionado 2 veces para la especificidad del gene. El uso del PCR en nido mejora la producción del producto específico del gene que es mayor cuando se emplea solamente un único par de oligonucleótidos, la primera reacción del PCR en nido involucró una secuencia de 2000 pb del gen *env* con los oligonucleótidos ED3 y ED14, posteriormente, la segunda reacción fue específica para amplificar la región de la gp120 de 1532 pb y se utilizaron los oligonucleótidos gpF y gpR.

La manipulación de las reacciones se realizó en un área exclusiva para reacciones de PCR separada del equipo termociclador (DNA Thermal Cycler 480, Perkin Elmer Cetus, Norwalk, CT) y de cualquier sustancia o templado que pudiera contaminar la reacción de PCR.

La mezcla de Reacción fue la siguiente:

Reactivo	Cantidad (volumen)
amortiguador de PCR 10x (MgCl ₂)	5 µL
DNTP's mix (d ATP, d GTP, d CTP, d TTP)	8 µL
oligonucleótidos a concentración de 100ng/µL	1 µL
oligonucleótidos a concentración de 100ng/µL	1 µL
agua bidestilada	33.5 µL
Platinum ⁵ Taq PCR _x DNA polymerase	0.5 µL
templado	1 µL
volumen final	50 µL

El templado se añadió en un lugar diferente del área exclusiva del PCR.

Los oligonucleótidos utilizados para la primera reacción de PCR fueron:

ED3 5' tta ggc atc tcc tat ggc agg aag aag cgg 3'

ED14 5' tct tgc ctg gag ctg ttt gat gcc cca gac 3'

Los oligonucleótidos usados en la segunda reacción de PCR:

gpF 5' gtc gac gcc acc atg aga gtg aag gag aaa tat cag c 3'

gpR 5' cta tct ttt ttc tct ctg cac cac tct tct 3'

El primer par de oligonucleótidos que se utilizó en el corrimiento del PCR fueron descritos previamente (Delwart y cols, 1993) y los proporcionó el Departamento de Inmunología y Enfermedades Infecciosas de la Escuela de Salud Pública de Harvard. El segundo par de oligonucleótidos fue diseñado para este proyecto en base a las secuencias encontradas en el banco de genes del Centro Nacional de Información en Biotecnología del Gobierno de los Estados Unidos de América (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Es importante mencionar que los oligonucleótidos que se diseñaron contaron con sitios de corte de enzimas de restricción que sirvieron para pasos posteriores.

El programa de amplificación para la primera reacción de PCR con los oligonucleótidos ED3 y ED14 fue el siguiente:

Paso	Etapa de la Reacción	temperatura/tiempo
1	desnaturalización inicial	94°C / 2 min
2	desnaturalización	94°C / 1 min
3	alineamiento	55°C / 1 min
4	extensión	72°C / 1 min
ir al paso 2 por 2 ciclos		
5	desnaturalización	94°C / 15 sec
6	alineamiento	55°C / 45 sec
7	extensión	72°C / 1 min
ir al paso 5 por 36 ciclos		
8	extensión final	72°C / 7 min

El programa de amplificación para la segunda reacción de PCR con los oligonucleótidos gpF y gpR fue el siguiente:

	Etapa de la Reacción	temperatura/tiempo
1	desnaturalización inicial	94°C / 4 min
2	desnaturalización	94°C / 1 min
3	alineamiento	57°C / 1 min
4	extensión	72°C / 3 min
ir al paso 2 por 2 ciclos		
5	desnaturalización	94°C / 15 seg
6	alineamiento	57°C / 45 seg
7	extensión	72°C / 1 min
ir al paso 5 por 36 ciclos		
8	extensión final	72°C / 7 min

Para el análisis de los productos de amplificación de PCR, se realizó un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 1.2 % en la solución amortiguadora TBE. La detección de los fragmentos amplificados se llevó a cabo mediante una tinción del gel con bromuro de etidio.

7.2.2 Clonación de los productos de PCR en el Sistema TOPO TA Cloning (M3).

El sistema TOPO TA Cloning (Invitrogen) es un sistema conveniente para la clonación de productos de la PCR. Debido a su construcción, contiene sitios para una buena eficiencia de ligación de los productos de PCR en el plásmido, ya que previene la recircularización del vector y adiciona una adenina en el extremo 3' del producto de PCR (Ausbel y cols, 1994).

La ligación de los productos de la PCR en el plásmido pCR2.1Topo se llevó a cabo con el siguiente protocolo:

1. Se realizó la siguiente mezcla para la reacción de clonación:

	Reacción Estándar
Vector TOPO	1 μ L
Producto de la PCR	2 μ L
Solución salina	1 μ L
Agua bidestilada estéril	Ajustar a volumen final de 5 μ L

2. Mezclar la reacción por pipeteo e incubar por 30 min a temperatura ambiente.

7.2.3 Transformación de bacterias ultra calcio-competentes OneShot® *E. coli* con plásmidos Topo-gp120 (M3).

Posterior a la reacción de ligación de la gp120 del VIH-1 Subtipo B con el pCR2.1Topo, se transformaron células calcio competentes One Shot® *E. coli*, bajo el siguiente protocolo:

1. Se prepararon 2 cajas petri con medio Luria Bertani (Agar LB, US Biological, Swampscoot, MA, USA) ampicilina 50 µg/mL, 40 µL de IPTG 100 mM y 40 µL de X-Gal 40 mg/mL por cada reacción de ligación.
2. Se procedió a descongelar en hielo los tubos conteniendo las bacterias calcio competentes.
3. Se agregaron 2 µL de la reacción de clonación a cada tubo conteniendo las bacterias, se mezcló con cuidado por pipeteo y se incubó en hielo por 30 min.
4. Se aplicó un shock térmico por 40 seg a 42°C en baño seco y posteriormente se mantuvo en hielo.
5. Se adicionaron a cada tubo 250 µL de medio SOC y se incubaron a 37°C y 225 rpm por una hora.
6. Se plaquearon en las cajas petri del paso 1 50 µL de las bacterias en medio SOC y se incubaron toda la noche (12-18 h) a 37°C.
7. Se procedió a la selección por fenotipo de las colonias de color blanco (Sambrook y Russell, 2001).

7.2.4 Minipreparación de plásmidos de bacterias transformadas (M4).

Se realizó la obtención del plásmido pCR2.1Topo de las bacterias transformadas llevando a cabo el siguiente protocolo:

1. Con ayuda de una puntilla de 20 μ L estéril, se tomó la colonia de bacterias que presuntivamente contenía el plásmido con el inserto de interés y se dejó crecer en 5 mL de caldo LB con 100 μ g/mL de ampicilina, hasta que el cultivo se encontró a una densidad óptica (O.D.₆₀₀) de 1.0. Se centrifugaron 3 mL del cultivo a 4,000 rpm por 10 min y 4°C.
2. Se descartó el medio de cultivo y la pastilla celular formada se resuspendió en 300 μ L de la solución amortiguadora P1 de resuspensión (QIAGEN).
3. Se añadieron 300 μ L de la solución amortiguadora P2 de lisis (QIAGEN) y se mezcló invirtiendo el tubo 5 veces gentilmente y se dejó incubar por 5 min.
4. Se adicionaron 300 μ L de la solución amortiguadora P3 de neutralización (QIAGEN) frío y se mezcló por invertir el tubo 5 veces; se incubó por 5 min en hielo.
5. Se equilibró una columna para minipreparación de plásmidos (< 20 μ g de ADN plasmídico) QIAGEN tip-20 al hacer pasar 1 mL de la solución amortiguadora QBT (QIAGEN).
6. Cada muestra de los tubos del paso 4 se centrifugó a 14,000 rpm. El sobrenadante se vació dentro de la columna del paso anterior y se dejó pasar por la misma.
7. La columna conteniendo el ADN plasmídico se lavó con 2 mL de la solución amortiguadora QC (QIAGEN) dos veces.
8. El ADN se eluyó de la columna al pasar 800 μ L de la solución amortiguadora QF de elusión (QIAGEN) por la misma y se colectaron en un tubo eppendorf.

9. El ADN se precipitó con 0.7 volúmenes de alcohol isopropílico absoluto, se incubó por 30 min a -20°C , se centrifugó a 14,000 rpm por 15 min.
10. Se decantó el sobrenadante y se adicionó 1 mL de alcohol etílico 70%, se lavó la pastilla y se dejó secar a 70°C para eliminar totalmente las trazas de alcohol.
11. La resuspensión del ADN plasmídico se hizo en la solución amortiguadora TE 1X a un volumen de 40-50 μL y se conservó a -20°C .
12. Se realizó un gel de agarosa al 0.8% para observar el plásmido y la presencia del ADN se reveló con tinción con bromuro de etidio (Sambrook y cols, 1989).

7.2.5 Caracterización del plásmido pCR2.1Topo conteniendo el inserto de gp120 del VIH-1 (M5).

Para verificar los plásmidos que contenían el inserto de la gp120 del VIH-1, se realizó un análisis de restricción con la enzima *EcoRI*, ya que el vector cuenta con dos sitios para esta enzima, flanqueando la posición del sitio de inserción del producto de PCR en su sitio de clonación múltiple. Para la reacción de restricción se utilizó la enzima *EcoRI* (Promega) en la solución amortiguadora H (Promega), a una concentración de 1 U/ μg , y el ADN se cuantificó por espectrofotometría a una longitud de onda 260-280nm. Por otra parte, se analizó la dirección con que se encontraba el inserto de la secuencia de gp120 en el plásmido. Para lograr este fin, se sabe que el vector cuenta con un sitio de restricción para la enzima *KpnI* a 51pb hacia la dirección del grupo 5' fosfato del sitio de clonación múltiple, y la secuencia de la gp120 con el mismo sitio, sólo que en dirección al grupo hidroxilo (3') a 123 pb del codón de inicio de la traducción. Por lo tanto, se realizó la digestión con la enzima *KpnI* (Promega) a 1 U/ μg de la enzima en la solución amortiguadora H a 37°C

por 12 h. Las reacciones de restricción se observaron en geles de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

7.3 Obtención del baculovirus recombinante

7.3.1 Subclonación del pTOPOGP-69 y pTOPOGP-HX en pFastBac1 (M6).

- Los plásmidos que contenían el inserto de la gp120 del VIH-I de paciente o de la cepa de referencia se nombraron pTOPOGP-69 y pTOPOGP-HX, respectivamente. Por separado, a cada uno de ellos se les extrajo la secuencia de la gp120 para clonarla en el plásmido donante pFastBac1, el cual tiene como principal característica que las secuencias que son adicionadas en su sitio de clonación múltiple (SCM) quedan bajo la regulación del promotor de la poliedrina, llamado pPolh, y en general tiene las siguientes características: posee dos elementos pequeños transponibles específicos mini-Tn7 a cada lado del SCM, resistencia a gentamicina y ampicilina. La extracción de la secuencia se realizó en base a la posición del inserto de la gp120 en los vectores, utilizando las enzimas *Sall* y *EcoRI* (Promega), al digerir en la solución amortiguadora H (Promega) por 12 h a 37°C con la enzima *Sall* a una concentración de 1U/μg de ADN plasmídico. Posteriormente, se inactivó la enzima a 95°C y se adicionó a la mezcla 1U/μg de la enzima *EcoRI* y se incubó por 12 h más a la misma temperatura. Se realizó un gel de agarosa al 1% para aislar la banda que contenía el inserto mediante el kit Concert (Gibco), siguiendo la metodología a continuación descrita:

1. Se cortó con un bisturí el área del gel de agarosa que contenía el fragmento de ADN a aislarse.
2. Se pesó en un tubo para microcentrífuga de 1.5 mL el fragmento del gel de agarosa, se agregó 30 μL de la solución amortiguadora de

- solubilización de gel (L1) por cada 10 mg de gel. Posteriormente se incubó a 50°C por 15 min hasta disolverlo.
3. Se colocó la columna de silicatos del sistema en un tubo para microcentrífuga de 2 mL y se adicionó la mezcla del paso anterior. Se centrifugó a 14,000 rpm por 1 min y se descartó el sobrenadante.
 4. Se adicionaron 500 μ L de la solución amortiguadora L1 a la columna, se centrifugó a 14,000 rpm por 1 min, se desechó el sobrenadante.
 5. Se colocó la columna de silicatos en un tubo de microcentrífuga y se agregó la solución amortiguadora de lavado (L2) y se incubó por 5 min a temperatura ambiente. Se centrifugó por 1 min a 14,000 rpm, se repitió la centrifugación para remover completamente el buffer y se descartó el sobrenadante.
 6. El ADN se eluyó al adicionar en la columna 50 μ L de la solución amortiguadora TE a 65°C e incubó por 1 min a temperatura ambiente, para posteriormente centrifugar a 14,000 rpm por 2 min 30 seg.
 7. Se observó la secuencia purificada en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

Por otra parte, se requirió linearizar el plásmido donante pFastBac1 al ser ADN circular. Asimismo, se seleccionaron, dentro del SCM del plásmido, los sitios de corte para las enzimas de restricción *Sa*II y *Eco*RI, dispuestas en el mismo en orden del extremo del grupo fosfato al hidroxilo del ADN, para ligar los fragmentos purificados de la gp120. Se procedió a digerir 500 ng del plásmido pFastBac1 con 0.5 U/ μ g de enzima *Sa*II en la solución amortiguadora H a 37°C por 4 h, posteriormente, se inactivó la enzima al exponerla por 15 min a 95°C, para finalmente agregar la enzima *Eco*RI a 0.5U/ μ g por 4 h a 37°C. El plásmido linearizado se purificó por la técnica de cloroformo-fenol a continuación descrita:

1. Se adicionó un volumen de fenol, se mezcló con ayuda de un vortex y se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min. Se separó la fase superior a un tubo limpio.

2. A la fase superior en un tubo limpio se le agregó 1 volumen de cloroformo (o Solución Sevag), se mezcló en vortex y se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min. La fase superior se transfirió a un tubo limpio.
3. Se agregó un volumen de alcohol isopropílico al 100% y se incubó a -20°C por 15 min. Se centrifugó por 10 min a 14,000 rpm.
4. Se desechó el sobrenadante, la pastilla se lavó con alcohol etílico 70% y se centrifugó a 14,000 rpm por 10 min.
5. El plásmido se resuspendió en $\approx 20 \mu\text{L}$ de la solución amortiguadora TE y se observó la conformación lineal en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio.

La ligación de la secuencia de la gp120 en el pFastBac1 se realizó al agregar $1 \mu\text{L}$ de la secuencia de la gp120 purificada del gel de agarosa con $1.5 \mu\text{L}$ del plásmido linearizado pFastBac1 en presencia de la enzima T4 Ligasa (Roche) en su solución amortiguadora de reacción por 4 h a 20°C . Se realizó la transformación de bacterias *Escherichia coli* calcio competentes cepa DH5 α (Sambrook y Russell, 2001) para seleccionar los plásmidos, la minipreparación de plásmidos (Sambrook y cols, 1989) y la digestión de los mismos con las enzimas de restricción *Sall* y *EcoRI*, para obtener como productos finales los plásmidos pFastBac1 conteniendo las secuencias de la gp120 (M7).

7.3.2 Transformación de bacterias *Escherichia coli* calcio competentes de alta eficiencia DH10Bac con plásmidos donantes pFastBac69 y pFastBacHX (M8).

Como se mencionó, las bacterias DH10Bac contienen el plásmido bMON14272, un replicón mini-F de bajo número de copias, el gen de resistencia a kanamicina, y un segmento de ADN que codifica el péptido lacZ de un vector de clonación basado en pUC. En el lado N-terminal del gene *lacZ*, se encuentra insertado un segmento corto que contienen los sitios de

unión para el transposon viral Tn7; éstos sitios no rompen el marco de lectura del péptido. Asimismo, contiene el plásmido pMON7124, el cual funciona como plásmido cooperador y tiene por objetivo principal, conferirle a las bacterias resistencia a tetraciclina y codificar la transposasa, que lleva a cabo la función de recombinar por transposición dirigida de los sitios mini-*att*Tn7 del pFastBac1 a los sitios miniTn7 del báculo el grupo de genes que se encuentren entre ellos.

Por lo tanto, después de determinar qué pFastBac contenía insertada la gp120 del VIH-1, se procedió a transformar bacterias *Escherichia coli* calcio competentes de alta eficiencia DH10Bac para la transposición de la secuencia blanco dentro del báculo, siguiendo el protocolo a continuación descrito:

1. Se prepararon 4 cajas petri con medio Agar Luria más 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Kanamicina, 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de tetraciclina, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de X-gal y 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de IPTG por cada báculo a obtener.
2. Se descongelaron las células calcio competentes de alta eficiencia DH10Bac en hielo. Se tomaron 100 μL de las células y se introdujeron en tubos de polipropileno de 15 mL y se procuró que la manipulación fuera en un tiempo breve.
3. Se adicionó 1 ng del plásmido recombinante en 5 μL de agua bidestilada estéril y se mezcló gentilmente. Se dejó incubar la mezcla en hielo por 30min.
4. Se realizó un choque térmico en un baño de agua a 42°C por 45 seg.
5. Posteriormente, se incubó en hielo por 2 min y se adicionaron 0.9 mL de medio SOC. Se incubó por 4 h a 37°C y 225 rpm.
6. Después de incubar las bacterias, se realizaron diluciones en serie de éstas con medio SOC a 10^{-1} , 10^{-2} y 10^{-3} (por ejemplo, 100 μL de mezcla de transposición y se diluyó en 900 μL de medio SOC es la dilución 10^{-1}).

7. Se transfirieron 100 μ L de cada dilución en las cajas petri del paso 1 con medio selectivo.
8. Finalmente, las muestras se incubaron por 24 h a 37°C.

7.3.3 Aislamiento del vector recombinante

La presencia del substrato cromogénico en los medio de cultivo de las bacterias (X-gal) y el inductor IPTG, ayudan en la identificación por fenotipo de colonia para presumir la presencia de un evento de transposición en la misma. Por lo tanto y de una manera muy general, las colonias de color blanco fueron seleccionadas para el aislamiento del vector recombinante, al ser incapaces de generar la enzima β -galactosidasa, la cual desdobla el X-gal y por la presencia del inductor IPTG generan un color azul a las colonias. Se realizó una minipreparación de plásmidos (Sambrook y cols, 1989) para obtener los bácmidos (**M9**). Se realizó un gel de agarosa al 0.5% para analizar el ADN del bácmido aislado. Debido al tamaño (más de 23,000 pb) del bácmido, para poder observar la transposición y de esta forma seleccionar el genoma del baculovirus recombinante, se requirió realizar un PCR con los primers internos de la gp120 del VIH-1 ED5 y ED12 que amplifican la región C2-V5 (1200pb) según la metodología de Rivera-Morales y cols. (2000).

Posteriormente al análisis de PCR, se realizó un análisis fenotípico con antibióticos Amp⁽⁻⁾ Kana⁽⁺⁾ de las clonas aisladas PCR-positivas, para esto se hizo crecer parte de las colonias en cajas petri con agar LB 50 μ g/mL de Kanamicina, 40 μ L de IPTG 100 mM y 40 μ L de X-Gal 40 mg/mL, y otra parte de las mismas colonias en agar LB con 50 μ g/mL de ampicilina (**M10**).

Por último, las clonas con transposición positiva por PCR específico se confirmaron mediante un primer del bácmido (M13F) y un primer interno de la gp120 (**M10**) (Rivera-Morales, 2000). Para observar las PCR, se realizó gel de agarosa al 1.0% teñido con bromuro de etidio.

0118302

7.4 Transfección de células Sf9 con los bácmidos Bac69 y BacHX (M11).

El proceso de transfección se llevó a cabo por triplicado para los dos genomas virales recombinantes. En una placa de 6 pozos se cultivaron por pozo 9×10^5 células de insecto Sf9 con 97% de viabilidad en 2 mL de medio SF900II y se incubó por una hora a 27°C. Por otra parte, se prepararon las soluciones a continuación descritas:

Soln. A: 5 μ L de Bácmido en 100 μ L de medio SF900II.

Soln. B: 6 μ L del liposoma catiónico CellFectin (Invitrogen, USA) en 100 μ L de medio SF900II.

Soln. C: 5 μ L de la solución amortiguadora TE en 100 μ L de medio SF900II.

Soln. D: 6 μ L de CellFectin en 100 μ L de medio SF900II

Soln. E: 5 μ L de Bácmido en 100 μ L de medio SF900II

Soln. F: 6 μ L de agua bidestilada estéril en 100 μ L de medio SF900II

Se realizaron las siguientes combinaciones:

Soln. A + Soln. B, se mezclaron cuidadosamente e incubaron por 45 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 0.8 mL de medio SF900II y se mezcló gentilmente. Al final, se obtuvo la mezcla de transfección A-B.

Soln. C + Soln. D, se mezclaron cuidadosamente e incubaron por 45 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 0.8 mL de medio SF900II y se mezcló gentilmente. Al final, se obtuvo la mezcla de transfección C-D.

Soln. E + Soln. F, se mezclaron cuidadosamente e incubaron por 45 min a temperatura ambiente. Se adicionaron 0.8 mL de medio SF900II y se mezcló gentilmente. Al final, se obtuvo la mezcla de transfección E-F.

Se llevó a cabo el lavado de las células Sf9 en los pozos con 2 mL de medio SF900II fresco. Se retiró el medio de las células y se agregaron las mezclas de transfección A-B, C-D y E-F según correspondiera y se incubaron cada una por espacio de 5 h a 27°C. Se retiraron las mezclas de transfección

y se agregaron 2 mL de medio SF900II fresco y se dejaron incubar por 72 h a 27°C. El sobrenadante se recuperó con ayuda de una micropipeta de 1 mL en un tubo estéril de 15 mL para centrifugación; se centrifugó a 4,000 rpm por 10 min y se recuperó en tubos para microcentrífuga de 1.6 mL. La conservación del baculovirus se logró al mantener los sobrenadantes en oscuridad a 4°C (M12).

7.5 Detección de la expresión de la proteína gp120 en la línea celular Sf9 (M13).

Se realizó el corrimiento electroforético del pellet de células transfectadas para separar por peso la proteína total celular y realizar la detección de la proteína por Western Blot, en gel de poliacrilamida de dos fases, una concentradora (stacking gel) al 4% y una separadora al 8%, siguiendo la metodología a continuación descrita:

1. Se retiró el gel de poliacrilamida y se mantuvo en la solución amortiguadora de transferencia II por 15 min.
2. Por otra parte, la membrana de nitrocelulosa se embebió en la solución amortiguadora de transferencia III por 15 min.
3. Se recortaron 10 piezas de papel filtro al tamaño del gel, y permanecieron en remojo: 4 en la solución amortiguadora de transferencia III, 4 en la solución amortiguadora de transferencia II y 2 en la solución amortiguadora de transferencia I.
4. Se montó en la base de la cámara de transferencia en sentido inferior a superior: las 2 piezas de papel filtro embebidas en la solución amortiguadora de transferencia I, las 4 piezas de papel filtro embebidas en la solución amortiguadora de transferencia II, el gel de acrilamida, la membrana de nitrocelulosa, las 4 piezas de papel filtro embebidas en la solución amortiguadora de transferencia III. Se cerró la cámara de transferencia y se conectó a la fuente de poder para transferir a una corriente de 2 mA/cm² por 2 h.

5. Se retiró la membrana de nitrocelulosa de los filtros, y el gel se mantuvo en la solución amortiguadora PBS por 15 min. Se cambió la solución amortiguadora PBS por nuevo y se mantuvo en lavado por 15 min en agitador orbital.
6. El bloqueo de la membrana se realizó con la solución amortiguadora PBS con leche descremada al 5% por 2 h.
7. Se desechó la solución de bloqueo y se lavó la membrana por triplicado, manteniéndolo en agitación por 15 min en un agitador orbital con la solución amortiguadora PBS con leche descremada al 0.1 %.
8. Se agregó el anticuerpo monoclonal isotipo IgG₁ anti-HIV-1 gp120 ratón proveniente de la clona P4D1-A7-F3, a una concentración de 1/1500 en la solución amortiguadora PBS con leche descremada al 0.1 % por 3 h. Se repitieron los lavados del paso 7.
9. El segundo anticuerpo (conjugado) anti-Ig-peroxidasa ratón, se agregó a una concentración de 1/2000 en la solución amortiguadora PBS con leche descremada al 0.1 % por 2 h, posterior a esto se repitieron los lavados del paso 7 y se mantuvieron en la solución amortiguadora PBS hasta su revelado.

7.5.1 Revelado del Western Blotting (M13).

Se empleó el sistema ECL Western Blotting Analysis System (Amersham Biosciences, London, Engl) el cual es un método no radiactivo de emisión de luz para la detección de antígenos específicos inmovilizados conjugados, directa o indirectamente con anticuerpos marcados con peroxidasa. El sistema cuenta con 2 soluciones; la solución 1 está compuesta por el diacilhidrácido cíclico llamado Luminol, y la solución 2 por fenol, como potenciador. El principio está basado en la reacción de oxidación del peróxido de hidrógeno en condiciones alcalinas del Luminol catalizada por la peroxidasa, inmediatamente entra en un estado excitado y para estabilizarse emite luz, toda esta reacción se amplifica hasta mil veces por los fenoles (Motsenbocker,

1968; Isacson y Watermark, 1974; Rosewell y White, 1979; Whitehead y cols, 1979). La metodología a continuación descrita fue la empleada para el revelado con quimioluminiscencia:

1. Se colocó la membrana en un vidrio limpio y libre de grasa, se retiró el exceso de buffer PBS.
2. En un tubo cónico de 15 mL se mezcló 1:1 a un volumen final de 2 mL la solución 1 y solución 2 del ECL Western Blotting Analysis System.
3. La membrana se cubrió perfectamente con la mezcla anterior y se protegió con papel plástico delgado (kleen pack).
4. Se colocó inmediatamente una placa fotográfica y se dejó por 3 min.
5. El revelado de la placa fotográfica se realizó con los reactivos Kodak GBX Developer and Replenisher (Eastman Kodak Cia, Rochester, NY, USA.) y se colocó 1 min en la solución reveladora.
6. Se lavó con agua corriente, y posteriormente se colocó en solución fijadora por 1 min.
7. Se procedió al lavado con agua corriente y se dejó secarse al aire.

Por otra parte, se realizó el revelado con Carbazole del Western Blotting. Para ello, la membrana se colocó en 12 mL de la solución amortiguadora de acetatos 0.05M pH 5, se adicionaron 4.5 mL de Carbazole, y 30 μ L de peróxido de hidrógeno 30%; la reacción se bloqueó con agua bidestilada estéril a los 30 seg a 2 min de agregar el peróxido. Este método de revelado es irreplicable, a diferencia del luminol.

7.6 Titulación del Baculovirus recombinante (M14).

El método que se utilizó para la titulación del baculovirus es considerado un método rápido y cuantitativo, lo cual es importante de destacar ya que la mayoría de los métodos empleados para este fin son cualitativos (Mena y cols, 2003). Para llevarlo a cabo, se prepararon dos placas de

polipropileno de 96 pozos por cada baculovirus, en cada uno se cultivó 5×10^3 células Sf9 en 50 μL de medio SF900II y 97% de viabilidad, se incubó por 60 min a 27°C. Se prepararon diez diluciones 1:10 a partir del stock viral en medio SF900II. En los primeros 16 pozos de la placa de polipropileno (A1:B8) se colocaron 10 μL de medio SF900II, en los siguientes 16 pozos (C1:D8) 10 μL del stock viral, y a partir de los pozos E1 al L8 de la primera placa con 16 repeticiones por dilución 10 μL de las diluciones 10^1 a 10^4 en cada columna, la segunda placa de polipropileno se utilizó para el resto de las diluciones (10^5 - 10^{10}) con el mismo número de repeticiones en los pozos respectivos. Cada placa se incubó a 27°C por 6 días en una bolsa con cierre hermético y con torundas humedecidas con agua estéril para favorecer un microambiente con saturación de humedad, para evitar la desecación del medio de cultivo.

Posterior al tiempo de incubación de las placas de polipropileno, se adicionaron a cada pozo 10 μL de una solución de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazolio) 5 g/L en agua bidestilada y se incubó en agitación por 2 h a temperatura ambiente. Se centrifugó cada placa por 10 min a 4,000 rpm. Las sales de formazan color magenta fueron disueltas en 50 μL de dimetilsulfóxido y se midió la absorbancia de éstas a 570 nm en un lector de microplacas. Las lecturas proporcionadas se procesaron en el programa Microsoft Excel v.10 for Windows XP y se obtuvieron los valores de media muestral por dilución y su desviación estándar. Asimismo, se procesaron los valores de absorbancia para obtener la curva de la concentración celular por viabilidad. La determinación de la Dosis Letal Media de la Población (TCLD_{50}) fue mediante la ecuación (1), lo cual resulta en una curva sigmoidal; se manejó el programa Sigmaplot 5.0 (SPSS Inc., Chicago IL, USA) para éstos datos.

Ecuación (1)
$$Y = Y_0 + a / [1 + (D/D_0)^b]$$

donde:

Y = Absorbancia

Y₀ = Valor mínimo de absorbancia

a = Valor máximo de absorbancia

D = Dilución

D₀ = Dil. con valor de Abs 50%

b = Pendiente de la curva de concentración celular

Se realizó un análisis de regresión lineal para convertir la TCLD₅₀ a Dosis de Infección Media del Tejido (TCID₅₀) con la ecuación (2). Finalmente, la ecuación (3) sirvió para determinar la unidad funcional de multiplicidades de infección (MOI) requeridas en procesos de infección de cultivos de células, la pfu (unidad formadora de placas).

Ecuación (2)
$$y = mx + b$$

donde:

m = Pendiente de la recta

x = Valores de x de la recta

b = Punto de intersección de la recta

Ecuación (3)
$$\text{pfu} = (\text{TCID}) 0.69$$

donde:

0.69 = Factor O'Relly y cols (1994)

8. RESULTADOS

8.1 Obtención de muestras de individuos infectados por el VIH (M1).

A partir de las muestras de sangre de individuos VIH positivos, se realizó el aislamiento del ADN genómico y se observó en un gel de agarosa al 1% en la solución amortiguadora TE teñido con bromuro de etidio. Se seleccionó el ADN de los pacientes 18 y 69 por la integridad observada al no presentar degradación genómica. La cantidad de ADN obtenida de los pacientes fue de 3.0 μg y 3.2 μg para el paciente 18 y paciente 69, respectivamente.

8.2 Amplificación de las secuencias del VIH-1 por PCR (M2).

Se llevó a cabo la PCR para los pacientes 18 y 69 (Figura 4). Asimismo, la cepa de referencia HXB2 sirvió de control positivo para la reacción. La reacción de PCR anidado involucró dos reacciones de PCR, con lo cual se aumentó la especificidad del producto obtenido; sin embargo, los productos de la primera reacción no fueron visibles en un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio. Por lo tanto, fue con la segunda reacción (específica) con la que se pudo observar. Para la amplificación de la secuencia de la gp120, el producto resultó de 1,542 pb, según el diseño de los oligonucleótidos.

Durante la amplificación de la gp120 se presentaron diversos problemas, ya que no se logró la consistencia de resultados al amplificar con una ADN polimerasa sintetizada y purificada no comercial. Por lo tanto, se utilizó una ADN polimerasa que se mantiene inactiva a temperatura ambiente por contener un anticuerpo unido al sitio activo, éste anticuerpo se libera del sitio activo a los 94°C, permitiendo que sólo inicie la síntesis de ADN cuando se encuentra en el primer ciclo de la PCR.

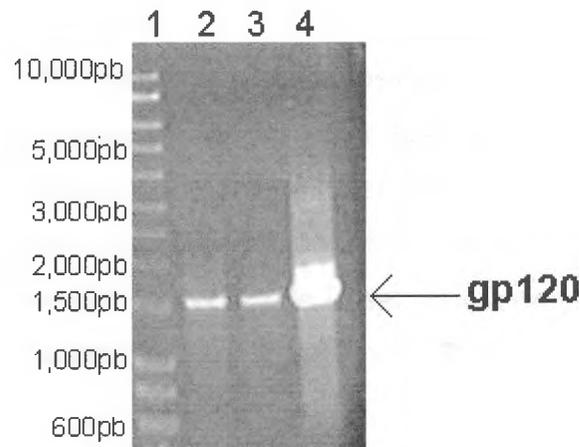


Figura 4. Reacción de PCR anidado con la amplificación de la gp120 del VIH-1. Gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, donde el carril 1 corresponde al marcador de peso molecular 1Kb, los carriles 2 y 3 son productos de PCR anidando de la gp120 del VIH-1 de los pacientes 18 y 69 respectivamente, el carril 4 es la amplificación de la gp120 de la cepa de referencia HXB2.

8.3 Clonación de los productos de PCR en el sistema de clonación TOPO TA (M3).

La clonación de la secuencia de la gp120 se realizó para el producto de PCR del paciente 69 y de la cepa de referencia HXB2 en el plásmido pCR2.1Topo. La selección del paciente mexicano fue dado por la consistencia de los resultados al amplificar la secuencia. El proceso de clonación no es observable *per se*, ya que se requiere de transformar bacterias con los plásmidos para poder realizar la selección de los vectores que contienen las secuencias de interés.

8.4 Transformación de bacterias calcio-competentes One Shot[®] *E. coli* con plásmidos Topo-gp120 (M3).

La transformación de bacterias calcio competentes con los plásmidos de la reacción de clonación con las secuencia de la gp120, fue el método empleado para la búsqueda de las cepas positivas, y se llevó a cabo mediante

el análisis del fenotipo del color de la colonia al romper el inserto (gp120) del marco de lectura del gen de β -galactosidasa, por lo cual las clonas seleccionadas fueron las colonias de color blanco porque son las que con mayor probabilidad pueden contener un plásmido clonado con la secuencia de interés. Se seleccionaron 9 colonias blancas para aislar y realizar el miniprep, tanto de los plásmidos que procedían de la secuencia de la gp120 del paciente No. 69 así como los que provenían del plásmido de referencia HXB2.

8.5 Minipreparación de plásmidos de bacterias transformadas (M4).

Se logró la obtención del ADN plasmídico de las 18 colonias bacterianas, 9 procedentes de la transformación con plásmidos clonados con la secuencia de la gp120 del VIH-1 del paciente No.69 y 9 más del plásmido de referencia HXB2. La nomenclatura de los plásmidos procedió del origen del vector de clonación pCR2.1TopoTA con la abreviatura pTTA, seguida con la clave 120 por el inserto. Posteriormente, el ADN de origen del inserto, ya sea 69 para las del paciente No.69 o HX para el plásmido de referencia, y por último, el número de la colonia aislada.

8.6 Caracterización del plásmido pCR2.1Topo conteniendo el inserto de la gp120 del VIH-1 (M5).

La caracterización de los plásmidos se llevó a cabo primero con una digestión de los mismos con la endonucleasa *EcoRI*, por tener flanqueado el sitio de clonación múltiple con secuencias blanco para ésta enzima, y se observó que las clonas bacterianas que contenían el inserto son las que liberaban una banda de aproximadamente 1,500 pb al ser vistas en un gel de agarosa al 1%. Para el paciente No. 69 las clonas con dicho inserto liberado fueron la 2, 3, 6, 7 y 8 (Figura 5). Por otra parte, las clonas que provenían de la cepa de referencia HXB2 que liberaron el inserto esperado, fueron la 2, 4, 5 y 9, todas ellas fueron numeradas de manera aleatoria (Figura 6).

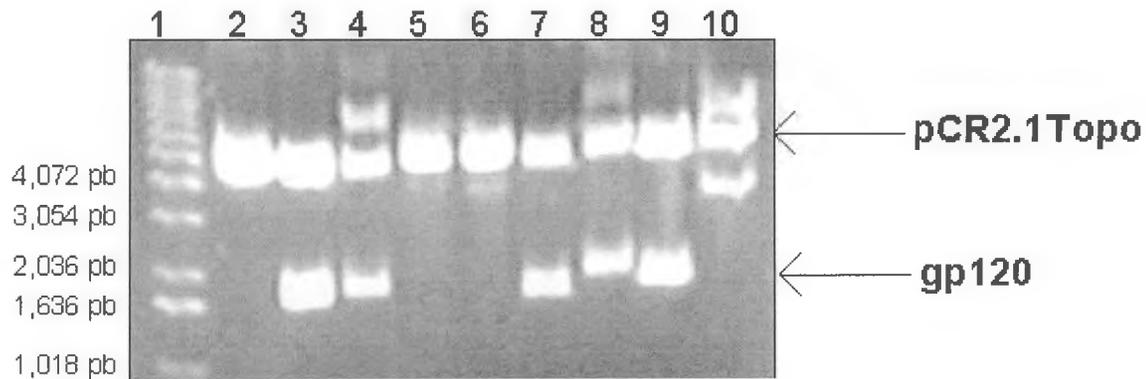


Figura 5. Digestión con *EcoRI* de plásmidos insertados con la gp120 del VIH-1 del paciente No. 69. Gel de agarosa al 1.0% teñido en bromuro de etidio, carril 1: marcador 1Kb, carril 2 al 10 serie de 9 plásmidos del pTTA-120-69-1 al pTTA-120-69-9.

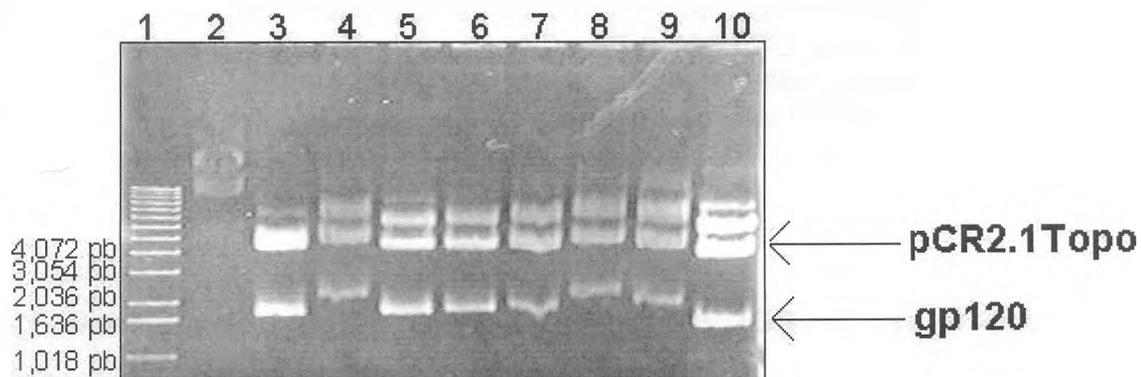


Figura 6. Digestión con *EcoRI* de plásmidos insertados con la gp120 del VIH-1 del plásmido HXB2. Gel de agarosa al 1.0% teñido en bromuro de etidio, carril 1: marcador 1Kb, carril 2 al 10 serie de 9 plásmidos del pTTA-120-HX-1 al pTTA-120-HX-9.

En el análisis de la dirección de la inserción de la secuencia gp120, al digerir todos los plásmidos con la endonucleasa de restricción *KpnI*, se obtuvieron productos con un peso de 4,000 pb y de 1,500 pb; por lo tanto, el inserto entró en dirección 3' a 5' con respecto al plásmido (Figura 7). Los plásmidos conteniendo la secuencia de la gp120 se denominaron pTTA-120-69-2, pTTA-120-69-3, pTTA-120-69-6, pTTA-120-69-7 pTTA-120-69-8, y pTTA-

120-HX-2, pTTA-120-HX-4, pTTA-120-HX-5 y pTTA-120-HX-9. Los plásmidos seleccionados para ser subclonados fueron el pTTA-120-69-3 y pTTA-120-HX-9, ya que en estos se observó claro y definido el inserto de la gp120 en la digestión con la endonucleasa *EcoRI*.

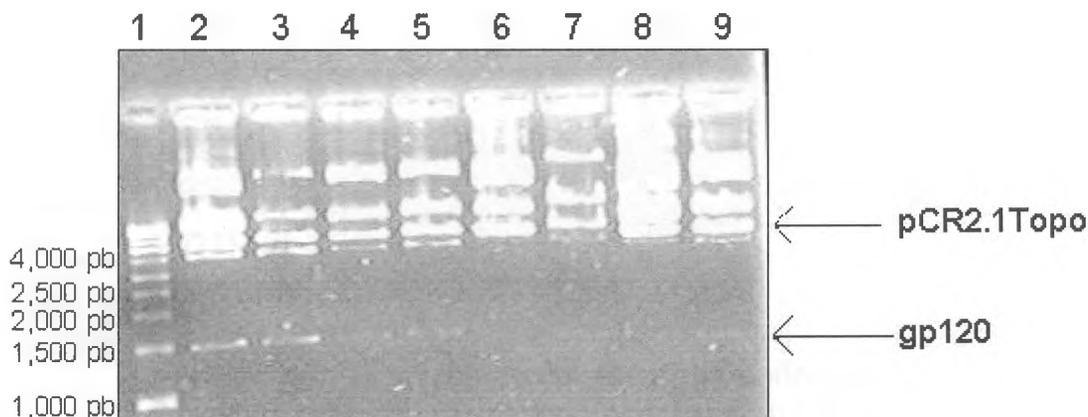


Figura 7. Digestión parcial con *KpnI* de plásmidos conteniendo la gp120 del VIH-1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.0% teñido en bromuro de etidio, carril 1: marcador de peso molecular 1Kb, carril 2: pTTA-120-69-2, carril 3: pTTA-120-69-3, carril 4: pTTA-120-69-6, carril 5: pTTA-120-69-7, carril 6: pTTA-120-69-8, carril 7: pTTA-120-HX-2 carril 8: pTTA-120-HX-4 y carril 9: pTTA-120-HX-9.

8.7 Subclonación del pTOPOGP-69 y pTOPOGP-HX en el plásmido donante pFastBac1 (M6).

La linearización del plásmido donante pFastBac1 de 4,775 pb de peso molecular, se llevó a cabo con las enzimas *Sall* y *EcoRI*. Posteriormente, se realizó la purificación del mismo por el método de Cloroformo-Fenol. Al final, se observó el producto mediante una banda de poco menos de 5,000 pb de peso molecular en una electroforesis en gel de agarosa al 1%, teñida con bromuro de etidio.

Por otra parte, el aislamiento de la secuencia de la gp120 de los plásmidos pTTA-120-69-3 y pTTA-120-HX-9 se realizó al hacer una digestión

completa con la endonucleasa de restricción *EcoRI*. Los productos de 1,542 pb se observaron en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio, y se purificaron por el método comercial Concert (Figura 8).

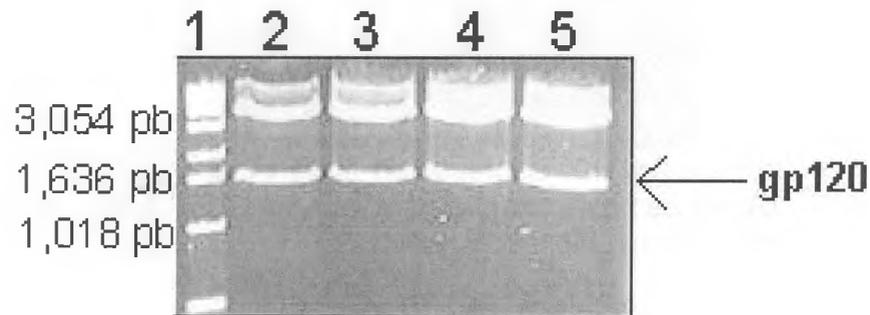


Figura 8. Digestión completa con la endonucleasa de restricción *EcoRI* de los plásmidos pTTA-120-69-3 (carriles 2 y 3) y pTTA-120-HX-9 (carriles 4 y 5).

Las secuencias de la gp120, tanto del paciente No. 69 así como del plásmido de referencia HXB2, fueron ligadas cada una a un vector donante pFastBac1 linealizado. Posteriormente, se observó el resultado al transformar células bacterianas *E. coli* DH5 α con los plásmidos provenientes de la ligación después de realizar la minipreparación de plásmidos. Los plásmidos donantes obtenidos tuvieron un peso molecular de 6,317 pb y se denominaron pFB1-69 y pFB1-HX; el primero corresponde al que contenía la secuencia de la gp120 del paciente mexicano y el correspondiente a la cepa de referencia HXB2.

La caracterización de los plásmidos (Estrategia Experimental, M7) se llevó a cabo por medio de un análisis de restricción con las enzimas *EcoRI* y *Sall* de la minipreparación de plásmidos. Se observó que los plásmidos que liberaron el fragmento de la gp120 de un tamaño esperado de 1,542pb, fueron pFB1-HX-5, pFB1-HX-10 y pFB1-69-5, como se puede observar en la Figura 9 en los carriles 5 y 10, y en la Figura 10 en el carril 6. Se seleccionaron ambas clonas para continuar la metodología, ya que en éstas se observó claro la liberación del inserto.

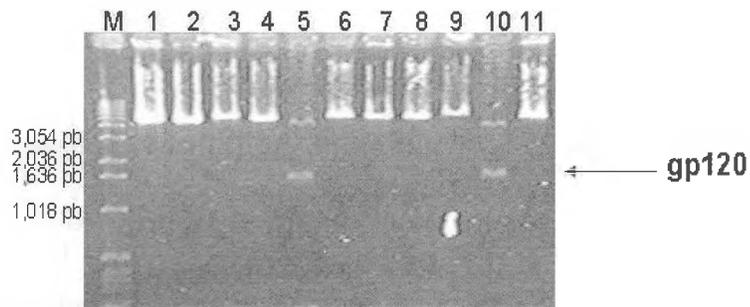


Figura 9. Análisis de restricción de plásmidos pFB1-HX clonas 1 a 11 con las enzimas *EcoRI* y *SalI* en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.



Figura 10. Análisis de restricción de plásmidos pFB1-69 clonas 1 a 11 con las enzimas *EcoRI* y *SalI* en un gel de agarosa 1% teñido con bromuro de etidio.

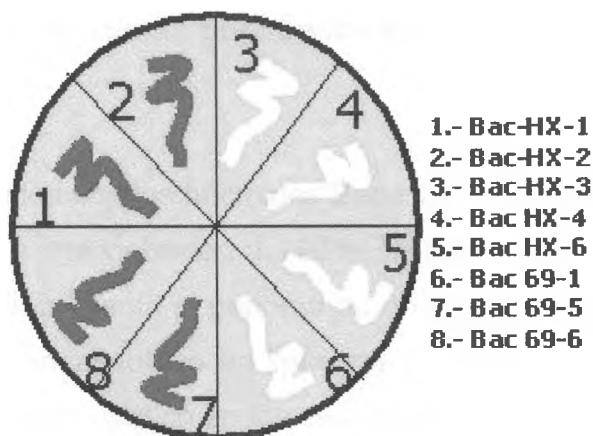
8.8 Transformación de células calcio competentes de alta eficiencia DH10Bac con plásmidos pFB1-69-5 y pFB1-HX-5 (M8 y M9).

La transformación de células calcio competentes DH10Bac con los plásmidos pFB1-69-5 y pFB1-HX-5 se observó mediante una minipreparación de plásmidos de alto peso molecular. Este paso se considera crucial, ya que al realizarlo se espera obtener los bácmidos que probablemente pudieran contener los eventos de transposición de las secuencias de la gp120, transferidas de los plásmidos donantes a los bácmidos. Los bácmidos obtenidos se denominaron Bac (de bácmido), HX o 69 según el caso de procedencia de la secuencia de la gp120, para el primero proveniente de la

cepa de referencia HXB2 y el segundo del paciente mexicano 69; seguido del número de colonia aislada, tomada al azar.

8.9 Aislamiento del vector recombinante (M10).

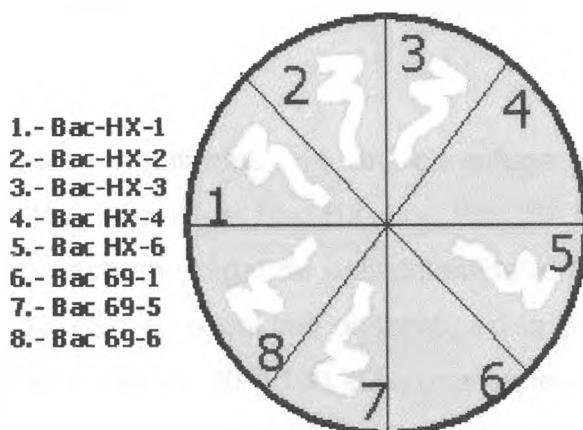
El análisis del vector recombinante se realizó fenotípica y genotípicamente. Un primer tamizaje consistió en realizar un PCR en nido de la región C2-V5 de la gp120 del VIH. En el análisis de PCR se pudo observar que ocho b́acmidos, a saber el Bac-HX-1, Bac-HX-2, Bac-HX-3, Bac-HX-4, Bac-HX-6, Bac-69-1, Bac-69-5 y Bac-69-6, contenían la secuencia de la gp120, al amplificar un producto de 1,200 pb. Por lo tanto, sólo a éstas colonias se les realizó un doble análisis fenotípico, que consistió en analizar la integridad del gene reportero *lacZ* y la resistencia a la kanamicina conferida por el b́acmido (Figura 11). Los resultados mostraron a las colonias con los b́acmidos Bac-HX-3, Bac-HX-4, Bac-HX-6 y Bac-69-1, con el marco de lectura interrumpido de dicho gene; por lo tanto, muy probablemente contenían el inserto de la gp120 por transposición. Asimismo, todas las colonias anteriormente mencionadas poseían la capacidad de crecer en kanamicina, ésta capacidad de crecer en antibiótico fue dada por el gene de resistencia a kanamicina contenido en el b́acmido. Se realizó un segundo análisis fenotípico para garantizar la ausencia del plásmido donante, resistente a la ampicilina, y fue obtenido al someter las colonias bacterianas a crecer bajo la presencia del antibiótico. Los resultados mostraron que las cepas Bac-HX-4 y Bac-69-1 fueron incapaces de degradar la ampicilina (Figura 12), por lo tanto, dichas colonias contenían b́acmidos con la gp120 insertada. De esta manera, los b́acmidos seleccionados para continuar la estrategia experimental fueron los provenientes de las colonias Bac-HX-4 y Bac-69-1.



- 1.- Bac-HX-1
- 2.- Bac-HX-2
- 3.- Bac-HX-3
- 4.- Bac HX-4
- 5.- Bac HX-6
- 6.- Bac 69-1
- 7.- Bac 69-5
- 8.- Bac 69-6

LB + kana (100ug/ml)
+ X-gal + IPTG

Figura 11. Análisis fenotípico de colonias bacterianas conteniendo b́acmidos (columna derecha) en medio agar LB con Kanamicina y el cromógeno X-gal y el potenciador IPTG.



- 1.- Bac-HX-1
- 2.- Bac-HX-2
- 3.- Bac-HX-3
- 4.- Bac HX-4
- 5.- Bac HX-6
- 6.- Bac 69-1
- 7.- Bac 69-5
- 8.- Bac 69-6

LB + ampi (100ug/ml)

Figura 12. Análisis fenotípico de colonias bacterianas conteniendo b́acmidos (columna izquierda) en medio agar LB con Ampicilina.

8.10 Transfección de células Sf9 con los bácmidos Bac69 y BacHX (M11 y M12).

La transfección con los bácmidos Bac-HX-4 y Bac-69-1 se realizó en 9×10^5 células Sf9 con una viabilidad del 97%. La primera mezcla de transfección, rotulada como A-B, contenía el genoma de un baculovirus recombinante (Bac-HX-4 o Bac-69-1) encapsulado en liposomas. Estas mezclas fueron capaces de generar un efecto citopático en las células de insecto Sf9. Por otra parte, no se observó ningún efecto citopático en las células que estuvieron en contacto con las mezclas de transfección C-D o E-F. En estas, se observó un aumento en la concentración celular, por lo tanto, no se encontraban invadidas por ningún genoma ajeno al celular.

8.11 Detección de la expresión de la proteína gp120 en la línea celular Sf9 (M13).

A las pastillas resultantes de la centrifugación de las células transfectadas con los Bácmidos Bac-HX-4 y Bac-69-1, se les realizó un corrimiento electroforético en un gel de poliacrilamida al 8% teñido en Azul de Comassie (Figura 13). En este gel, se observó, en la parte correspondiente entre los pesos moleculares de 90 y 100 kDa, una proteína que no se observó en el control negativo, la cual presumiblemente era la gp120 recombinante. Un segundo gel de poliacrilamida al 8% se utilizó para realizar la transferencia a membrana de nitrocelulosa para realizar el Western blot. Como anticuerpo específico para la detección de la rgp120 se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-HIV-1 gp120 de ratón. El revelado del Western blot se realizó por quimioluminiscencia con Luminol, también se reveló por proceso enzimático, con una hidrólisis del peróxido de hidrógeno. En ambos métodos, se detectó la producción de la rgp120 en las células de insecto, (Figura 14). Los sobrenadantes colectados de las células transfectadas fueron donde se

encontró el baculovirus recombinante para gp120, y es el stock viral que se conserva a 4°C y en obscuridad.

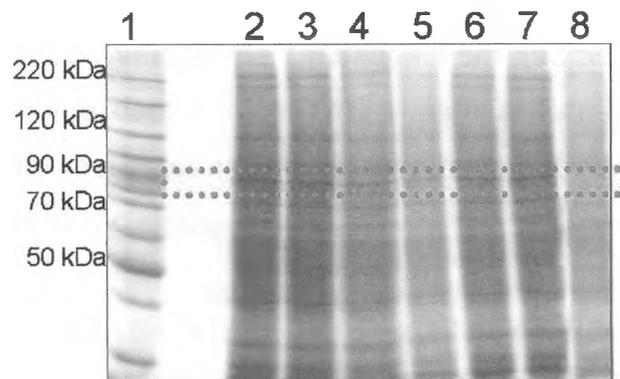


Figura 13. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 8% de lisado celular total de células *Sf9* transfectadas con los bácmidos recombinantes para gp120 del VIH-1. Observe en él área punteada la proteína presente en las células transfectadas, a diferencia del control (carril 8). Carril 1: Marcador de proteínas 220-10kDa, Carriles 2-4: Pellet de células transfectadas con Bac-HX-4, Carriles 5-7: Pellet de células transfectadas con Bac-69-1, Carril 8: Pellet de células sin transfección.

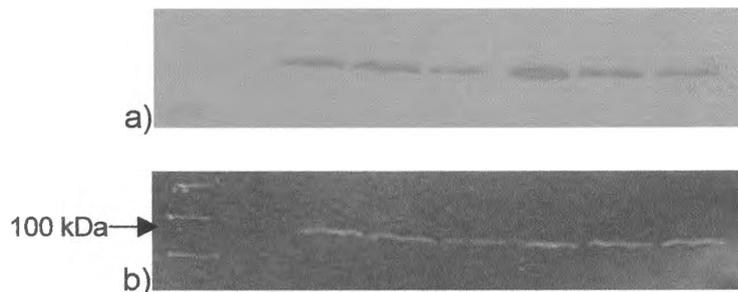


Figura 14. Detección con el anticuerpo monoclonal IgG₁ anti-HIV-1 gp120 ratón y un conjugado anti IgG ratón-peroxidasa de la proteína recombinante gp120 del VIH-1 en pellet celular total de células *Sf9* transfectadas con el vector baculoviral recombinante. Las bandas coinciden en peso molecular a las observadas en la Fig.16. a) Revelado por quimioluminiscencia por Luminol b) Revelado por reacción enzimática de Hidrólisis del peróxido de hidrógeno.

8.12 Titulación del Baculovirus recombinante (M14).

Los baculovirus recombinantes fueron titulados según el método de Mena y cols (2003), para lo cual, los datos fueron procesados en el paquete estadístico Sigma Plot SPSS. Los valores de Unidades Formadoras de Placas para el bácmido Bac-HX-4 fue de $1.41 \times 10^7/\text{ml}$ y para el Bac-69-1 fue de $1.37 \times 10^7/\text{ml}$; por lo tanto, se determinó la concentración viral en los stocks para infección de células como sigue:

Titulo del Bácmido Bac-HX-4

TCLD₅₀ = $1.51 \times 10^6/\text{ml}$

TCID₅₀ = $2.04 \times 10^7/\text{ml}$

pfu/ml = $1.41 \times 10^7/\text{ml}$

Titulo del Bácmido Bac-69-1

TCLD₅₀ = $1.47 \times 10^6/\text{ml}$

TCID₅₀ = $2.01 \times 10^7/\text{ml}$

pfu/ml = $1.37 \times 10^7/\text{ml}$

Con estos resultados, comprobamos la implementación del sistema IC-BEVS al obtener un baculovirus recombinante que expresa la proteína heteróloga gp120 del VIH-1 subtipo B en cultivo de células de insecto.

9. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se logró la implementación del sistema de expresión de proteínas heterólogas basado, en cultivos de células de insecto infectados con vectores de expresión baculovirales (IC-BEVS), para esto se realizó la construcción de dos baculovirus recombinantes, ambos portadores del gene heterólogo gp120 del VIH-1, con diferencias en el origen del ADN, ya que uno fue aislado del plásmido de referencia HXB2 y otro de un paciente mexicano. Asimismo, se logró la expresión de las gp120 recombinantes en cultivos *in vitro* de la línea celular de insectos *Sf9*.

Algunas de las mayores ventajas que posee el sistema IC-BEVS, en comparación con los sistemas de expresión de *E. coli*, de *Staphylococcus aureus*, el de células de mamíferos y con el de levaduras, es el obtener un alto nivel de expresión del producto, así como ser el único que ha recibido aprobación de la FDA para pruebas clínicas (The Recombinant Protein Handbook, Amersham Biosciences, UK). Asimismo, a diferencia del sistema de expresión de *Escherichia coli*, éste sistema tiene la capacidad de llevar a cabo los procesos postraduccionales que dan origen a la maduración de proteínas, tales como N- y O-glicosilación, fosforilación, acilación de ácidos grasos, α -amidación, amidación N-terminal, carboximetilación, isoprenilación, plegamiento de proteínas, corte de péptido señal, corte de sitio proteolítico, (Gooche y cols, 1991).

La selección del sistema de expresión a implementar, se enfocó en base a la capacidad del mismo para producir proteínas recombinantes que funcionen como subunidades de vacunas, observando que en los últimos años, mediante este sistema, se han producido y expresado proteínas en células de insecto de varios virus animales como: la lengua azul, el parvovirus porcino y canino, peste porcina clásica y el virus de la peste equina africana.

Incluso, se han logrado expresar varias proteínas a la vez en forma semejante a la del virión ("Virus like particles VLP" o partículas que parecen virus) como es el caso de la lengua azul, produciéndose un producto de gran capacidad inmunogénica. Recientemente, se ha desarrollado una vacuna de subunidad frente al virus de la peste porcina clásica (VPPC), usando exclusivamente la glicoproteína (gp 55) mediante un sistema de baculovirus. Esta proteína induce la producción de anticuerpos neutralizantes capaces de proteger de la infección causada por el virus silvestre (Sánchez-Vizcaino, 2001). Algunos otros ejemplos de las proteínas producidas en el sistema IC-BEVS con importancia médica-clínica, son el antígeno de superficie del Virus de la Hepatitis B (Miao y cols, 1998), la proteasa NS3 del Virus de la Hepatitis C, de gran utilidad enzimática en el ciclo del virus (Hou y cols, 2003); el antígeno asociado a carcinoma hepatocelular HCA587 utilizado como blanco para inmunoterapia, presenta una capacidad antigénica similar a la contraparte natural (Li y cols, 2003); las glicoproteínas gp48 y gp53 del Virus de la Diarrea Viral Bovina que presentan inmunoreacciones similares a las nativas (Chimeno-Zoth y cols, 2001); la producción de Hormona de Crecimiento Humana (Geng y cols, 2002) y el Interferón β (Smith y cols, 1983).

En el presente estudio, un enfoque importante fue la selección de la proteína a expresar en el sistema IC-BEVS, y, considerando que el VIH es uno de los principales problemas de salud pública en el mundo, se seleccionó la gp120 del VIH-1 para ser expresada con perspectiva a ser una vacuna de subunidad. Lo anterior concuerda con algunos estudios recientes, los cuales sugieren que para una respuesta inmune óptima por parte del hospedero infectado por el VIH, son importantes los carbohidratos unidos a la gp120 durante los procesos postraduccionales. En uno de los estudios se observó la limitación de la respuesta inmune a una gp160 nativa, al analizarla en 3 formas diferentes de la glicoproteína modificadas para la N-glicosilación en los sitios 4°, 5° y 6° (Reitter y cols, 1998). Asimismo, se ha observado que eliminar los sitios conservados de glicosilación de la gp120, no se potencia la

respuesta inmune humoral, y a nivel de inmunidad celular, la pérdida del extremo carboxilo de la proteína reduce significativamente la eficacia de los LTC's contra el virus (Chakrabarti y cols, 2002). Por lo tanto, algunos investigadores sugieren que gran parte del éxito en la respuesta inmune está dado no sólo por fenómenos postraduccionales, sino también por el proceso de traducción, ya que dicha respuesta ha sido potenciada con cambios en los codones de la gp120 para crear una proteína sintética, y aunque los ARNm en citoplasma estén a una concentración similar entre el grupo que recibió la proteína sintética y el control con la proteína silvestre, el primero genera una mejor respuesta inmune humoral y celular (André y cols, 1998).

Al momento existen diversas estrategias para la producción de un inmunógeno seguro contra el VIH-1; muchas de ellas se basan en la producción de subunidades estructurales del virus, ya sea la gp160 que es el producto de la traducción del gen Env del virus, o del producto de la escisión de la gp160 que son la gp120 y la gp41, siendo la primera de especial interés por el contacto directo con el receptor CD4. Asimismo, los trabajos que ya destacan por encontrarse en etapa de ensayo clínico son AIDSVAX MN y AIDSVAX B/B derivadas del subtipo B en fase II de pruebas clínicas y sintetizadas por la Compañía VaxGen; una rgp120 CM235/SF-2 derivada de los subtipos B y E se encuentra en fase I y II de pruebas clínicas en Tailandia, y es producida por la Compañía Chiron. Por último, la rgp160 THO23/LAI-DID derivada de los subtipos B y E, que se encuentra en fase I y II de pruebas clínicas, producida por Aventis-Pasteur (Heilman, 2003).

Es importante hacer mención sobre la primera y única vacuna que al momento se encuentra en la fase más avanzada de pruebas clínicas. Se trata de la AIDSVAX B/B y AIDSVAX B/E de la compañía VaxGen; ambas son una preparación bivalente de gp120 recombinantes, y se encuentran en Fase III en Norte América, Europa y Tailandia, con resultados al momento controversiales, ya que sólo confiere protección a poblaciones reducidas; no

respuesta inmune humoral, y a nivel de inmunidad celular, la pérdida del extremo carboxilo de la proteína reduce significativamente la eficacia de los LTC's contra el virus (Chakrabarti y cols, 2002). Por lo tanto, algunos investigadores sugieren que gran parte del éxito en la respuesta inmune está dado no sólo por fenómenos postraduccionales, sino también por el proceso de traducción, ya que dicha respuesta ha sido potenciada con cambios en los codones de la gp120 para crear una proteína sintética, y aunque los ARNm en citoplasma estén a una concentración similar entre el grupo que recibió la proteína sintética y el control con la proteína silvestre, el primero genera una mejor respuesta inmune humoral y celular (André y cols, 1998).

Al momento existen diversas estrategias para la producción de un inmunógeno seguro contra el VIH-1; muchas de ellas se basan en la producción de subunidades estructurales del virus, ya sea la gp160 que es el producto de la traducción del gen Env del virus, o del producto de la escisión de la gp160 que son la gp120 y la gp41, siendo la primera de especial interés por el contacto directo con el receptor CD4. Asimismo, los trabajos que ya destacan por encontrarse en etapa de ensayo clínico son AIDSVAX MN y AIDSVAX B/B derivadas del subtipo B en fase II de pruebas clínicas y sintetizadas por la Compañía VaxGen; una rgp120 CM235/SF-2 derivada de los subtipos B y E se encuentra en fase I y II de pruebas clínicas en Tailandia, y es producida por la Compañía Chiron. Por último, la rgp160 THO23/LAI-DID derivada de los subtipos B y E, que se encuentra en fase I y II de pruebas clínicas, producida por Aventis-Pasteur (Heilman, 2003).

Es importante hacer mención sobre la primera y única vacuna que al momento se encuentra en la fase más avanzada de pruebas clínicas. Se trata de la AIDSVAX B/B y AIDSVAX B/E de la compañía VaxGen; ambas son una preparación bivalente de gp120 recombinantes, y se encuentran en Fase III en Norte América, Europa y Tailandia, con resultados al momento controversiales, ya que sólo confiere protección a poblaciones reducidas; no

obstante, otros modelos no han avanzado de la etapa I de pruebas clínicas (Heilman, 2003; Tramont and Johnston, 2003).

Por otro lado, se realizó la titulación de los baculovirus recombinantes obtenidos de la transfección, los cuales constituyen el stock viral, lo anterior debido a que conocer el título viral es un factor indispensable para realizar infecciones futuras. En el caso de los baculovirus, el desconocer la pfu/ml de cada stock viral conlleva a realizar infecciones sin conocimiento de la cantidad de virus a aplicar, si el número de virus es menor al requerido por el número de células la producción de la proteína recombinante será muy pobre desperdiciando material y equipo. Por el contrario, si la concentración del virus llega a ser mas alta que la celular, se multiplica el número de partículas defectivas virales producto de la infección, llevando a la pérdida del baculovirus recombinante por simple competencia con las partículas defectivas en las infecciones secundarias. (Kool y cols, 1991; Wickham y cols, 1991; Coen and Ramig, 1996). El método empleado para la titulación viral es innovador ya que es cuantitativo, a diferencia de los tradicionales como son el end point dilution y el de conteo en placa, ambos tienen en común el ser métodos cualitativos (Mena y cols, 2003), no existen a la fecha reportes del empleo de éste método de titulación en baculovirus recombinantes que expresen proteínas diferentes a la fosfatasa alcalina, por lo cual concordamos con Mena y cols. (2003) que el método propuesto por ellos puede ser utilizado por cualquier baculovirus recombinante.

10. CONCLUSIONES

Los logros obtenidos con el presente trabajo son mencionados a continuación:

- Se construyeron dos baculovirus recombinantes que incluyeran como gen foráneo la gp120 del VIH-1 Subtipo B, una secuencia obtenida del plásmido de referencia HXB2 y otra secuencia de un paciente mexicano.
- Se logró la expresión en células de insecto *in vitro* de la rgp120 de los baculovirus recombinantes construidos.
- Se implementó el sistema de expresión de proteínas recombinantes, basado en cultivo de células de insecto-vectores baculovirales.
- Se estandarizó la reacción en cadena de la polimerasa para amplificar la secuencia de la gp120 del VIH-1.
- Se aisló y clonó una secuencia completa de la gp120 del VIH-1 de un paciente mexicano.
- Se aprendió el manejo de las líneas celulares de insecto *in vitro* Sf9 y Tn5B1-4.

11. PERSPECTIVAS

Algunos de los principales aportes del presente trabajo es la implementación del sistema cultivo de células de insecto-vectores baculovirales, así como la construcción de dos baculovirus recombinantes que expresaran la proteína gp120 del VIH-1 Subtipo B y asimismo expresar la proteína viral recombinante en cultivo de células de insecto *Sf9*.

En base al trabajo anterior, se abren nuevos horizontes de estudio, estableciendo al momento las siguientes perspectivas:

- Evaluación como inmunógeno de la gp120 recombinante para medir respuesta inmune humoral y celular en ratones ó ratas. La estrategia a seguir, es realizar un protocolo tradicional de inmunización para posteriormente obtener linfocitos y con estos realizar las pruebas de respuesta inmune. También, es importante hacer mención que se administrará la gp120 al menos con 2 adyuvantes diferentes para medir cual de ellos genera una mejor respuesta inmune.
- Purificación de la gp120 producida en el sistema IC-BEVS. Esta reportado un método para la purificación de la proteína, sin embargo, requiere una cantidad de 40 L de cultivo, por lo tanto, lo más factible es realizar un empacado de columnas para purificación con el anticuerpo monoclonal para gp120.
- Producción *in vitro* en cultivo de células High Five de la gp120 recombinante. Cuando se realiza la producción a gran escala de proteínas recombinantes es recomendable utilizar ésta línea celular, ya

que produce, al menos, cinco veces más proteína recombinante que la Sf9, sin embargo, no es recomendable para multiplicación del virus ya que aumenta el número de partículas virales defectivas.

- Caracterización de los niveles de glicosilación de la gp120 recombinante. Es importante medir los niveles de glicosilación de la proteína, para con esto relacionar el proceso postraducciona con la respuesta inmune.

12. RESUMEN

En el presente trabajo, se implementó el sistema cultivo de células de insecto-vectores baculovirales (IC-BEVS) para la producción de la proteína recombinante gp120 del VIH-1 subtipo B. Para lograrlo, se aisló la secuencia genética de la gp120 de un paciente mexicano (No. 69) y del plásmido de referencia HXB2, dichas secuencias se clonaron en el plásmido donante pFastBac1; con éste plásmido se transformaron células bacteriales *E. coli* DH10Bac que contienen el genoma completo del baculovirus AcMNPV, en éstas células se indujo una transposición dirigida para transferir las secuencias de la gp120 al genoma baculoviral, mediante análisis fenotípicos y genotípicos se detectó a los baculovirus recombinantes, con lo cual se obtuvieron dos baculovirus recombinantes con la secuencia de la gp120 del VIH-1, uno del paciente mexicano No. 69 (Bac-69-1) y otro del plásmido de referencia HXB2 (Bac-HX-4). Con el genoma desnudo de los baculovirus inmerso en liposomas, se transfectaron cultivos de células de insecto *Sf9*. Mediante la técnica de Western blot se detectó con el anticuerpo monoclonal IgG₁ anti-HIV-1 gp120 ratón la producción de la proteína recombinante gp120 en las células de insecto. Por último, se realizó la titulación de los baculovirus recombinantes obteniendo para el Bac-69-1 una pfu/ml de 1.37×10^7 /ml, y para el Bac-HX-4 una pfu/ml = 1.41×10^7 /ml.

13. LITERATURA CITADA

- André, S., B. Seed, J. Eberle, W. Schraut, A. Bultmann y J. Haas (1998) Increased immune response elicited by DNA vaccination with a synthetic gp120 sequence with optimized codon usage. *J Virology*. 72: 1497-1503.
- Artenstein, A, A.E. Coppola, J.K. Brown, E. Carr, E. Sanders-Buellk, Jr. Galbarini, T.C. Mascola, P. VanCott, P. Schonbroodand, F. Mc-Cutchan *et al* (1995) Multiple introductions of HIV-1 subtype E into the Western Hemisphere. *Lancet*. 346: 1197-1198.
- Arthos, J., K.C. Deen, M.A. Chaikin *et al* (1989) Identification of the residues in human CD4 critical for the binding of HIV. *Cell*; 57: 469.
- Ausbel, M., R. Brent, R.E. Kingston, D.D. Moore, J.G. Seidman, J.A. Smith y K. Struhl (1994) *Current protocols in molecular biology*. NY: Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, USA.
- Ayres, MD, S.C. Howard, J. Cuzio, M.L. Ferber y RD Posee (1994) The complete DNA sequence of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus. *Virology*. 202: 586-605.
- Balter M. (1998) New HIV strain could pose health threat. *Science*. 281: 1425-1426.
- Barre-Sinoussi, F, J.C. Chermann, F. Rey, et al (1983) Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220: 868-871.
- Blissard, G.W. and GF Rohrmann (1990) Baculovirus diversity and molecular biology. *Annu Rev of Entomol*. 35: 127-155.
- Böhnlein, S, J. Hauber y B.R. Cullen (1989) Identification of a U5-specific sequence required for efficient polyadenylation within the human immunodeficiency virus long terminal repeat. *J Virol*. 63: 421.

- Brodine, SK, P.J. Mascola, S.I. Weiss, K.R. Ito, A.W. Porter, F.C. Artenstein, F.E. Garland, F. McCutchan y D.S. Burke (1995) Detection of diverse HIV-1 genetic subtypes in USA. *Lancet*. 346: 1198-1199.
- Brodine, S, J.R. Mascola y F.E. McCutchan (1997) Genotypic variation and molecular epidemiology of HIV. *Infect Med*. 14: 739-748.
- Brown, PH, L.S. Tiley y B.R. Cullen (1991) Efficient polyadenylation within the human immunodeficiency virus type 1 long terminal repeat requires flanking U3-specific sequences. *J Virol*. 65: 3340.
- Buonaguro, L, F.M. Buonaguro, M.L. Tornesello, D. Mantas, E. Beth-Giraldo, R. Wagner, S. Michelson, M.C. Prevost, H. Wolf, G. Giraldo (2001) High efficient production of Pr55 (gag) virus-like particles expressing multiple HIV-1 epitopes, including a gp120 protein derived from an Ugandan HIV-1 isolate of subtype A. *Antiviral Res*. 49: 35-47.
- Buonaguro, L, L. Racioppi, M.L. Tornesello, C. Arra, M.L. Visciano, B. Biryahwaho, S.D. Sempala, G. Giraldo y F.M. Buonaguro (2002) Induction of neutralizing antibodies and cytotoxic T lymphocytes in Balb/c mice immunized with virus-like particles presenting a gp120 molecule from a HIV-1 isolate of clade A. *Antiviral Res*. 54: 189-201.
- Burke, DS and F.E. McCutchan (1997) Global distribution of Human Immunodeficiency Virus-1 Clades. *AIDS. Biology, diagnosis, treatment and prevention*. Fourth edition. Eds. V.T. De Vita, S. Hellman and S.A. Rosenberg. Lippincott-Raven Publishers.
- Cabello, A, M. Cabral, M.E. Vera, R. Kiefer, R. Azorero, J. Eberle, L. Gürtler y A. Von Brunn (1995) Analysis of the V3 loop sequences from 10 HIV type 1-infected AIDS patients from Paraguay. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 11: 1135-1137.
- Campbell, M, L. Renshaw-Gegg, R. Renne, P.A. Luciw (1994) Characterization of the internal promoter of simian foamy viruses. *J Virol*. 68: 4811.

- Candal, DH, C.P. Pau, C.C. Luo, T. Granade, H. Stetler, L. Amador, R. Meza, C. Nuñez, G. Schochetman, J.R. George (1997) Genetic variability of HIV type 1 in Honduras. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 13: 349-1350.
- Campodonico, M, W. Janssens, L. Heyndrickx, K. Fransen, A. Leonaers, F.F. Fay, M. Taborda, G. Van Der Groen y O. Fay (1996) HIV type 1 in Argentina and genetic heterogeneity of the V3 Region. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 12: 79-81.
- CDC (Center for Disease Control) (1982) Epidemiologic aspects of the current outbreak of Kaposi's sarcoma and opportunistic infections. *N Engl J Med*. 306: 248-252.
- Chakrabarti, BK, W. Kong, B. Wu, Z.Y. Yang, J. Friborg, X. Ling, S.R. King, D.C. Montefiori y G.J. Nabel (2002) Modifications of the Human Immunodeficiency Virus envelope glycoprotein enhance immunogenicity for genetic immunization. *J Virol*. 76: 5357-68.
- Chakraborty, S, Kanhaisingh, A, Greenfield, PF, Reid, S, Monsour, C, and R. Teakle (1995) In vitro production of wild type Heliothis baculoviruses for use as biopesticides, *Australian Biotech.*, 5:82-86.
- Chimeno-Zoth, S., O. Taboga, G. König, A. Pereda, E.L. Palma, M.E. Piccone (2001) Expresión y caracterización de dos proteínas estructurales del virus de la diarrea viral bovina (VDVB). *Revista Argentina de Microbiología*. 33: 33-38.
- Chou, Q, M. Russell, D.E. Birch, J. Raymond and W. Bloch (1992) Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucl. Acids Res*. 20: 1717-1723.
- Claus, J.D., G.E. Remondetto, S.A. Guerrero, A.M. Demonte, A.M. Murguía and A.J. Marcipar (1993) *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus replication in serum free and serum reduced insect cell cultures. *J. Biotechnol*. 31: 1-15.
- Coen, D.M. and R.F. Ramig (1996) *Viral genetics: Fields Virology*. Eds. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howle, *et al.* Lippincot-Raven, USA. pp 113-151.

- Clewley, J.P., C. Arnold, K.L. Barlow, P.R. Grant y J.V. Parry (1996) Diverse HIV-1 genetic subtypes in UK. *Lancet*. 347: 1487.
- Cullen, B.R. (1991) Human immunodeficiency virus as a prototypic complex retrovirus. *J Virol*. 65:1053.
- Curran, J.W., D.N. Lawrence, H. Jaffe *et al* (1984) Acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) associated with transfusions. *N Engl J Med*. 310: 69-75.
- Dalglish, A.G., P.C Beverly, P.R. Clapham *et al*. (1984) The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature*. 312: 763.
- Davis, HL, M.L. Michel y R.G. Whalen (1995) DNA-based immunization in mice induces a potent MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocyte response to hepatitis B surface antigen. *Human Gene Therapy*. 6: 1447-1456.
- Delwart, E.L., E.G. Shaper, J. Louwagie, F.E. McCutchan, M. Grez, H. Rubsamen-Waigmann y J.I. Mullins (1993) Genetic relationships determined by a DNA heteroduplex mobility assay: analysis of HIV-1 env genes. *Science*. 262: 1257-1261.
- De Moraes, R.R. y J.E. Maruniak (1997) Detection and indentification of multiple baculoviruses using the polymerase chain reaction (PCR) and restriction endonuclease analysis. *J Virolo Met*. 63: 209-217.
- DeZazzo, J.D., J.M. Scott y M.J. Imperiale (1992) Relative roles of signals upstream of AAUAAA and promoter proximity in regulation of Human Immunodeficiency Virus type 1 mRNA 3' end formation. *Mol Cell Biol*. 12: 5555-5562.
- DiFalco, M.R., E. Bakopanos, M. Patricelli, G. Chan and LF Congote (1997) The influence of various insect cell lines, p10 and polyhedrin promoters in the production of secreted insulin like growth factor-interlukin 3 chimeras in the baculovirus expression system. *J. Biotechnol*. 56: 49-56.

- Essex, M., M.F. McLane, T.H. Lee, *et al* (1983) Antibodies to cell membrane antigens associated with human T-cell leukemia virus in patients with AIDS. *Science*. 220: 859-862.
- Essex, M. (1994) Confronting the AIDS vaccine challenge. *Technol. Rev.* 97: 23-29.
- Essex, M. (1997) Origin of AIDS. Eds. V.T. DeVita, S. Hellman, S.A. Rosenberg, J. Curran, M. Essex, A.S. Fauci. AIDS: Etiology, diagnosis, treatment and prevention, Fourth edition. Lippincott -Raven Publishers. USA. pp. 1-74.
- Fransen, K., A. Buve, J.N. Nkengasong, M. Laga and G. Van der Groen (1996) Longstanding presence in Belgians of multiple non-B HIV-1 subtypes. *Lancet* 347: 1403.
- Freed, E.O., D.J. Myers y R. Risser (1990) Characterization of the fusion domain of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp41. *Proc Natl Acad Sci USA*. 87: 4650-4654.
- Gallo, R.C., P.S. Sarin, E.P. Gelmann, *et al*. (1983) Isolation of human T-cell leukemia virus in acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*. 220: 865.
- Gallo, R.C., S.Z. Salahuddin, M. Popovic, G.M. Shearer *et al* (1984) Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science*. 224: 500.
- Gellin, B. (1998) The Jordan Report 98: Accelerated development of vaccines. Division of Microbiology and Infectious Diseases, National institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health. pp: 95-113.
- Geng, Z.H., Y. Liu, P. Gao, D.M. Zhao, S. Li, X.D. Yu y B.Z. Zhang (2002) Enhancing hGH expression level in insect cells by shortening the 5'-UTR of hGH cDNA. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 18: 505-508.

- Golden, A., D.A. Austen, M.R. van Schravendijk, B.J. Sullivan, E.S. Kawasaki y M.S. Osburne (1998) Effect of promoters and signal sequences on the production of secreted HIV-1 gp120 protein in the baculovirus system. *Protein Expr Purif.* 14: 8-12.
- Gonda, M.A., F. Wong-Staal, R.C. Gallo, J.E. Clements *et al* (1985) Sequence homology and morphogenic similarity of HTLV-III and visna virus, a pathogenic lentivirus. *Science* 227: 173.
- Gooche, C.F., M.J. Gramer, D.C. Andersen, J.B. Bahr y J. Rasmussen (1991) The oligosaccharides of glycoproteins. *Biotechnol.* 9: 1347-1355.
- Gottlieb, M.S., R. Schroff, H.M. Schanker, *et al* (1981) *Pneumocystis carinii* pneumonia and mucosal candidiasis in previously healthy homosexual men: evidence of a new acquired cellular immunodeficiency. *N Engl J Med.* 305: 1425-1431.
- Grace, TD. (1962) Establishment of four strains of cells from insect tissue grown in vitro. *Nature.* 195: 788-789.
- Granados, R.R. (1980) Infectivity and mode of action of baculoviruses. *Biotechnology Bioeng.* 23: 1377-1405.
- Gudino, JC, F. Martinez, P. Alcantara y C. Soler (1996) Genotyping of mexican HIV-1 isolates. (Abstract 2071). XI International AIDS Conference. Vancouver, Canada.
- Heilman, C. The Jordan Report: 20th Anniversary, Accelerated development of vaccines 2002. National Institute of Health, US Department of Health and Human Services, USA. 126-131.
- Hofmann, C., V. Sanding, G. Jennings, M. Rudolph, P. Schalag y M. Strauss (1995) Efficient gene transfer into human hepatocytes by baculovirus vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 92: 10099-100103.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>
- Hou, L.H., G.X. Du, R.B. Guan, Y.G. Tong y H.T. Wang (2003) In vitro assay for HCV serine proteinase expressed in insect cells. *World J Gastroenterol.* 9: 1629-1632.

- Hu, S.L., S.G. Korowski y J.M. Dalrymple (1986) Expression of AIDS virus envelope in recombinant vaccinia viruses. *Nature*. 320: 537-539.
- Isacson, U. and G. Watermark (1974) *Anal. Chim. Act.* 68: 339-362.
- Jaffe, H.W., D.P. Francis, M.F. McLane, *et al* (1984) Transfusion-associated AIDS: serologic evidence of human T-cell leukemia virus infection of donors. *Science*. 223: 1309.
- Kang, C.Y. (1997) Expression of human immunodeficiency virus genes using baculovirus expression system. *Mol Biotech.* 8: 173-187.
- Klatzmann, D., F. Barre-Sinoussi, M.T., Nugeyre, *et al* (1984) Selective tropism of lymphadenopathy-associated virus (LAV) for helper-inducer T-lymphocytes. *Science*. 225: 59.
- Kool, M., J.W. Voncken, F.L.J. van Lier, J. Tramper y J.M. Vlak (1991) Detection and analysis of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus mutants with defective interfering properties. *Virology*. 183: 739-746.
- Korber, B., C. Kuiken, B. Foley, B. Hahn, F. McCutchan, J. Mellors y J. Sodroski (Eds): *Human Retroviruses and AIDS* (1998) Los Alamos: Theoretical Biology and Biophysics. Group T-10. Los Alamos National Laboratory. USA.
- Korber, B., J. Theiler y S. Wolinsky (1998) Limitations of a molecular clock applied to considerations of the origin of HIV-1. *Science*. 280: 1868-1871.
- Kunansont, C., H. Foy, J. Kreiss *et al* (1995) HIV-1 subtypes and male to female transmission in Thailand. *Lancet*. 345: 1078-1083.
- Lara, C., M. Sallberg, B. Johansson, I.L. de Rivera y A. Sonnerborg (1997) The honduran human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) epidemic is dominated by HIV-1 Subtype B as determined by V3 domain sero- and genotyping. *J Clin Microbiol.* 35: 783-784.
- Lasky, L.A., G. Nakamura, D.H. Smith *et al* (1987) Delineation of a region of the human immunodeficiency virus type-1 gp120 glycoprotein critical for interaction with the CD4 receptor. *Cell*. 50: 975.

- Li, B, H.Y. Wu, X.P. Qian, Y. Li y W.F. Chen (2003) Expression, purification and serological analysis of hepatocellular carcinoma associated antigen HCA587 in insect cells. *World J Gastroenterol.* 9: 678-682.
- Lochelt, M., W. Muranyi y R.M. Flugel (1993) Human foamy virus genome possesses an internal, Bel-1-dependent and functional promoter. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90: 7317.
- Lochelt, M., S.F. Yu, M.L. Linial y R.M. Flugel (1995) The human foamy virus internal promoter is required for efficient gene expression and infectivity. *Virology.* 206: 601.
- Luckow, V.A. and M.D. Summers (1988) Trends in the development of baculovirus expression vectors. *Biotechnology.* 6: 47-55.
- Luckow, V.A., (1991) Cloning and expression of heterologous genes in insect cells with baculovirus vectors, recombinant DNA technology and applications, Eds. A. Prokop, R. Bajpai and C. Ho. Ed. MC Graw-Hill, Inc. New York, USA. pp. 97- 52.
- Maeda, S. (1995) Further development of recombinant baculovirus insecticides. *Curr Opin Biotechnol.* 6: 313-319.
- Mariani, S.M. y P.H. Krammer (1997) Detection of active infection of Sf9 insect cells by recombinant baculoviruses. *J Virol Met.* 69: 19-28.
- Mena, J.A., O.T. Ramirez y L.A. Palomares (2003) Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *Biotechniques.* 34: 260-264.
- Michel, M.L., H.L. Davis, M. Schleef, M. Mancini, P. Tiollains y R.G. Whalen (1995) DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: aspects to the humoral response mimic hepatitis B viral infection in humans. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92: 5307-5311.
- Miller, L.K. (1996) Insect viruses, *Fields Virology.* Eds. B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, et al. Ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, USA. pp: 533-556.
- Motsenbocker, M.A. (1968) *J. Biolum Chemilum.* 2: 9-16.

- Masur, H, M.A. Michelis, J.B. Greene, I. Onorato, R.A. Stouwe, R.S. Holzman, G. Wormser, L. Brettman, M. Lange, H.W. Murray y S. Cunningham-Rundles (1981) An outbreak of community-acquired *Pneumocystis carinii* pneumonia: initial manifestation of cellular dysfunction. N Engl J Med. 305: 1431-1438.
- Miao, J., X. Cong, W. Tan (1998) Rapid construction of recombinant baculovirus carrying hepatitis B virus surface antigen gene by using a novel baculovirus shuttle vector(Bacmid). Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi. 12: 245-248.
- Mildvan, D., U. Mathur, R.W. Enlow, *et al* (1982) Opportunistic infections and immune deficiency in homosexual men. Ann Intern Med. 96: 700-704.
- Myers, G. y G.N. Pavlakis (1992) Evolutionary potential of complex retroviruses. Eds. J. Levy. The Retroviridae. New York, USA, Ed. Plenum Press. pag: 1
- Oleske, J, A. Minnefor, R.Jr. Cooper *et al* (1983) Immune deficiency syndrome in children. JAMA. 249: 2345-2349.
- O'Reilly, D.R., L.K. Miller and V.A. Luckow (1994) Baculovirus expression vectors: A laboratory manual. Oxford University Press. USA.
- Palomares, L.A. and O.T. Ramírez (1998) Insect cell culture: Recent advances, biogineering challenges and implications in protein production, Advances in Bioprocess Engineering II. Eds. E. Galindo and O.T. Ramirez. Kluwer Academic Publihers Dordrecht. pp. 25–52.
- Palomares, L.A., F. Kuri-Breña and O.T. Ramírez (2001) Industrial Recombinant Protein Production. The encyclopedia of Life Support Systems. Eds. D. Al Gobaisi, Ed. EOLSS Publishers-UNESCO. In press.
- Peet, N.M., J.A. McKeating, B. Ramos, T. Klonisch, J.B. De Souza, P.J. Delves and T. Lund (1997) Comparison of nucleic acid and protein immunization for induction of antibodies specific for HIV-1 gp120. Clin Exp Immunol. 109: 226-32.

- Piot, P., T.C. Quinn, H. Taelman, *et al* (1984) Acquired immunodeficiency syndrome in a heterosexual population in Zaire. *Lancet*. 2: 65.
- Race, E., P. Frezza, D.M. Stephens *et al* (1995) An experimental chemically inactivated HIV-1 vaccine induces antibodies that neutralize homologous and heterologous viruses. *Vaccine* 13: 54-60.
- Reitter, J.N., R.E. Means and R.C. Desrosiers (1998) A role for carbohydrates in immune evasion in AIDS. *Nat Med*. 4: 679-684.
- Renjifo, B., J. Blackard, W. Klaskala, B. Chaplin, P. Shah, M.F. McLane, F. Barin, J. Esparza, J.E. Zelaya, S. Osmanov, R. Soto, J.A. Fernandez, M. Baum y M. Essex (1999) HIV-1 subtype B in Honduras. *Virus Res*. 60: 191-197.
- Richards, P., M. Matthews and P. Christin (1998) Ecological consideration for the environmental impact evaluation of recombinant baculovirus insecticides. *Ann Rev Entomol*. 43: 493-517.
- Rivera-Morales, L.G., V.A. Novitsky, R. Trujillo, C. Lavallo-Montalvo, C. Cano-Domínguez, J. Ramos-Jiménez, E. Jiménez-Ríos, L. Flores-Flores, P. López-Guillen, P. Gilbert, F. Vannberg, R. Tamez-Guerra, C. Rodríguez-Padilla and M. Essex (2000) The Molecular epidemiology of HIV type I of men in Mexico. *AIDS Res Hum Ret*. 17: 87-92.
- Rubinstein, A., M. Sicklick, A. Gupta, *et al* (1983) Acquired immunodeficiency with reversed T4/T8 ratios in infants born to promiscuous and drug-addicted mothers. *JAMA*. 249: 2350-2356.
- Rosewell, D.F. and E.H. White (1978) *Methods in Enzimology*. Eds. M.A. Deluca. Ed. Academic Press, NY, USA. pp: 409-423.
- Sabino, E., R. Diaz, L. Brigido, G. Learn, J. Mullins, A. Reingold, A. Duarte, A. Mayer and M. Bush (1996) Distribution of HIV-1 subtypes seen in AIDS clinic in Sao Paulo city, Brazil. *AIDS*. 10: 1579-1584.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. Secc 1.32-1.34.

- Sambrook, J. and D.W. Russell (2001) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. USA. Secc. 1.116-1.118.
- Sánchez-Vizcaino Rodríguez, J.M. *Curso Digital de Inmunología y Enfermedades Infecciosas Animales*, Universidad Complutense de Madrid. <http://www.sanidadanimal.info/> ISBN Dep. Legal: B-19442-2001. ISBN: 84-699-4740-0
- Sharkey, D.J., E.R. Scalice, K.G. Christy, S.M. Atwood and J.L. Daiss (1994) Antibodies as thermolabile switches: high temperature triggering for the polymerase chain reaction. *BioTechnology*. 12: 506-509.
- Simon, F., P. Mauclore, P. Roques, I. Loussert-Ajaka, M. Müller-Trutwin, S. Saragosti, M.C. Georges-Courbot, F. Barre-Sinoussi y F. Brun-Vezinet (1998) Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nature Med*. 4: 1032-1037.
- Smith, G.E., M.J. Fraser and M.D. Summers (1983) Molecular engineering of the *Autographa California* nuclear polyhedrosis virus genome: deletion mutations within the polyhedrin gene. *J Virol*. 46: 584-593.
- Smith, G.E., M.D. Summers and M.J. Fraser (1983) Production of human β -interferon in insect cells infected with a baculovirus expressions vector. *Mol Cell Biol*. 3: 2156-2165.
- Sonigo, P., M. Alizon, K. Staskus, D. Klatzmann *et al* (1985) Nucleotide sequence of the visna lentivirus; relationship to the AIDS virus. *Cell*. 42: 369.
- Sonnabend, J, S.S. Witkin y D.T. Purtilo (1983) Acquired immunodeficiency syndrome, opportunistic infections, and malignancies in male homosexuals: a hypothesis of etiologic factors in pathogenesis. *JAMA*. 249: 2370-2374.
- Soler-Claudin, C. and J.C. Gudino-Rosales (1995) 11 years since the discovery of the human immunodeficiency virus. *Salud Pública Mex*. 37: 499-509.
- Soler-Claudin, C and J.C. Gudino-Rosales (1998) Subtyping of HIV-1 in Mexico by envHMA and gagPCR-FLP (Abstract 11198). 12th International AIDS Conference, Geneva, Suiza.

- Soto-Ramirez, L., B. Renjifo, R. Marlink and M. Essex (1996) Mexican HIV-1 V3 loop sequences grouped according to route of transmission (Abstract 2081). XI International AIDS Conference, Vancouver (Canada).
- Tramont, E.C., and M.I. Johnston (2003) Progress in the development of an HIV vaccine. *Expert Opin Emerg Drugs*. 8: 37-45.
- Teakle, R.E. (1995) Prospects for the use of baculovirus as bioinsecticides. *Australian Biotech*. 5: 345-348.
- Valsamakis, A., S. Zeichner, S. Carswell and J.C. Alwine (1991) The human immunodeficiency virus type-1 polyadenylation signal-A 3' long terminal repeat element upstream of the AAUAAA necessary for efficient polyadenylation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 88: 2108.
- Vallee, K. and H. Carre (1904) Sur l'anemie infectieuse du cheval. *Acad Sci*. 139: 1239.
- Van Harmelen, J., R. Wood, M. Lambrick, E. Rybicki, A. Williamson and C. Williamson (1997) An association between HIV-1 subtypes and mode of transmission in Cape Town, South Africa. *AIDS*. 11: 81-87.
- Vaughn, J. (1999) Insect cell culture, protein expression, *Encyclopedia of Bioprocess Technology, Fermentation, Biocatalysis and Bioseparation*. Eds. M.C. Flickinger and S.W. Drew. Ed. Jhon Wiley and Sons, New York, USA. pp: 1444-1457.
- Vazquez-Valls, E., R. Cheingsong-Popov, J.J. Sierra-Quevedo, S. Lister, F. Lopez Marquez, J. Weber, L. Zuniga-Gonzalez, P. Campos-Lopez y J. Esparza (1996) Monotypic HIV-1 subtype B in Guadalajara, Mexico (Abstract 2070). XI International AIDS Conference, Vancouver, Canada.
- Vazquez-Valls, E., J.J. Sierra-Quevedo, F.C. Lopez-Marquez, M. Escoto-Delgadillo, M.C. Lopez-Lomeli y P.I. Campos-Lopez (1998) No differences in Mexico between HIV-1 subtype B, sexual preferences and routes of transmission (Abstract 11180). 12th World AIDS Conference, Geneva, Suiza.

- Vialard, J.E., B.M. Arif and C. Richardson (1995) Introduction to the molecular biology of baculoviruses. *Methods in Molecular Biology: Baculovirus Expression Protocols*. Eds. C.D. Richardson. Ed. Human Press Inc, Totowa, N. Jersey. USA. pp: 1-24.
- Visnovsky, G. and J. Claus. (1994) Influence of time and multiplicity of infection on the batch production of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in lepidopteran insect cellcultures. *Advances in Bioprocess Engineering*. Eds. E. Galindo y O.T. Ramirez. Ed. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, USA. pp: 123-128.
- Vlak, J.M., F.A. Klinkenberg, K.J.M. Zaal, M. Usmany, E.C. Klinge-Roode, J.B.F. Geervliet, J. Roosien and J.W.M. Van Lent (1988). Functional studies on the p10 gene of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus using a recombinant expressing a p10-b-galactosidase fusion gene. *J Gen Virol*. 69: 765-776.
- Warren R., M. Wong, G. Melcher, S. Blatt, P. Cahn, H. Perez, I. Zapiola, M.B. Bouzas, G. Muchnik, S. Anderson y R. Kennedy (1995) Serologic evaluation of human immunodeficiency virus Type 1 infected individuals from Argentina and the United States indicates a similar distribution of subgroup B isolates. *J Clin Microbiol*. 33: 481-483.
- Westfall, B. *et al.* (1997) *Focus*® 19, pp 46.
- Wickham, T.J., T. Davis, R.R. Granados, D.A. Hammer, M.L. Shuler y H.A. Wood (1991) Baculovirus defective interfering particles are responsible for variations in recombinant protein productions as a function of multiplicity of infection. *Biotechnol Letters*. 13: 483-488.
- Whitehead, T.P. *et al.* (1979) High-density lipoprotein cholesterol analysis. *Clin Chem*. 25: 1531-1546.
- Williams, G.V., D.Z. Rohel, J. Kuzio and P. Faulkner (1989) A cytopathological investigation of *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus p10 gene function using insertion-deletion mutants. *J Gen Virol*. 70: 182-202.

Wood, H.A. (1995) Development and testing of genetically improved baculovirus insecticides, Baculovirus expression systems and biopesticides. Eds. M.L. Shuler, H.A. Wood, R.R. Granados y D.A. Hammer. Ed. Wiley-Lyss, New York, USA. pp: 91-102.