

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“GENERACIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL PARA LA
PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES
CONTRA LA PROTEÍNA ENV DEL XMRV (XENOTROPIC
MURINE LEUKEMIA VIRUS-RELATED VIRUS)”**

**PRESENTADO POR:
I.B.T. ALÍ FRANCISCO CITALÁN MADRID**

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN TERMINAL
EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

OCTUBRE, 2011

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA**



**“GENERACIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL PARA LA
PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES
CONTRA LA PROTEÍNA ENV DEL XMRV (XENOTROPIC
MURINE LEUKEMIA VIRUS-RELATED VIRUS)”**

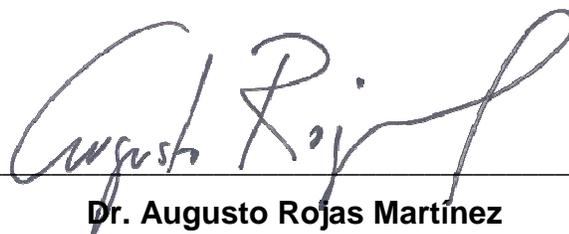
**PRESENTADO POR:
I.B.T. ALÍ FRANCISCO CITALÁN MADRID**

**Como requisito parcial para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN TERMINAL
EN BIOLOGÍA MOLECULAR E INGENIERÍA GENÉTICA**

OCTUBRE, 2011

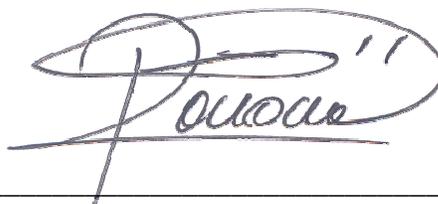
**“GENERACIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL PARA LA PRODUCCIÓN DE
ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA LA PROTEÍNA ENV DEL XMRV
(XENOTROPIC MURINE LEUKEMIA VIRUS-RELATED VIRUS)”**

Aprobación de la Tesis:



Dr. Augusto Rojas Martínez

Director de Tesis.



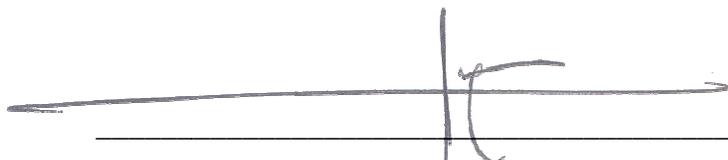
Dra. Rocío Ortiz López

Co-Director de Tesis



Dra. María de los Ángeles Castro Corona

Co-Director de Tesis



Dr. Med. Gerardo Enrique Muñoz Maldonado

Subdirector de Estudios de Posgrado

El presente trabajo fue realizado en el Laboratorio de Terapia Génica del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina, en la Unidad de Terapia Génica y Celular del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDCS), ambos de la Universidad Autónoma de Nuevo León, N.L. y en el Laboratorio de Inmunología del Centro de Ciencias Básicas de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Ags. Bajo la dirección del Dr. Augusto Rojas Martínez, la Co-Dirección de la Dra. Rocío Ortiz López y la Dra. María de los Ángeles Castro Corona.

Vo.Bo.



DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ

Director de Tesis

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer al Dr. Augusto Rojas Martínez por haber aceptado ser mi director de tesis y por brindarme la oportunidad de iniciarme en el campo de la investigación científica.

A la Dra. Rocío Ortíz López por haber sido parte de la comisión de tesis y por decirme que le pusiera ganas al trabajo.

A la Dra. María de los Ángeles Castro Corona por haberme dedicado algo de su tiempo para formar parte de la comisión de tesis.

A la Dra. Eva María Salinas Miralles por brindarme su tiempo y ayuda con la inmunización de los conejos e interpretación de los resultados. A Renata Roldán por ayudarme con la parte técnica de los ensayos de Western blot.

A Daniel Cervantes por ayudarme siempre con las dudas que surgían en el proyecto y con las cuestiones técnicas detrás de las mismas.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León y Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular de la Facultad de Medicina por abrirme sus puertas para cursar mis estudios de posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por apoyarme con una beca para cursar mis estudios de posgrado.

DEDICATORIA

Este trabajo está dedicado a mi familia, que aunque sé que no hemos estado juntos durante estos últimos años, que son tantos, siempre han estado allí y jamás me han dejado de apoyar. Para ellos, que siempre me han dado alguna frase de apoyo y aliento para continuar en este largo camino. Y sin tomar en cuenta orden alguno de importancia para nombrarlos: Everardo, Analí, Merlin Brian, Almita Analí, Leonardito, esto es por Ustedes.

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN	<i>iii</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>v</i>
LISTA DE TABLAS	<i>vii</i>
LISTA DE ABREVIATURAS	<i>viii</i>

<i>CAPÍTULO</i>	<i>PÁGINA</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. La vía antiviral 2-5A/RNasa L y el XMRV	2
1.2. El XMRV y el cáncer de próstata (CaP)	4
1.3. El XMRV y el síndrome de fatiga crónica (CFS)	8
1.4. Biología y patofisiología del XMRV	10
1.4.1. Infectividad y tropismo del XMRV	13
1.4.2. Métodos hipotéticos de transmisión del XMRV	15
1.5. Las herramientas de investigación para el XMRV	17
1.5.1. Generación de anticuerpos policlonales	18
1.5.2. Vectores adenovirales en la producción de anticuerpos policlonales	19
1.6. Justificación	22
II. OBJETIVOS	23
2.1. Objetivo general	23
2.2. Objetivos específicos	23
III. MATERIALES Y MÉTODOS	24

3.1. Material biológico	24
3.1.1. Animales de laboratorio	24
3.1.2. Bacterias competentes y líneas celulares	24
3.1.3. Plásmidos	25
3.1.4. Anticuerpos	25
3.2. Materiales y reactivos	26
3.3. Estrategia general	28
3.3.1. Construcción del pAdCMV-envX	28
3.3.2. Producción del vector AdCMV-envX	30
3.3.3. Purificación del vector AdCMV-envX	30
3.3.4. Titulación en placa del AdCMV-envX (TCID ₅₀)	31
3.4. Producción de anticuerpos policlonales contra <i>env</i> del XMRV	31
3.5. Evaluación de la especificidad de los sueros obtenidos de conejos	32
3.5.1. Ensayos de Western blot	32
3.5.2. Ensayos de inmunocitoquímica	33
IV. RESULTADOS	34
4.1. Generación del pAdCMV-envX	34
4.2. Producción, purificación y titulación del vector AdCMV-envX	38
4.3. Evaluación de los sueros obtenidos de conejos	40
V. DISCUSIÓN	44
VI. CONCLUSIONES	50
VII. BIBLIOGRAFÍA	51

RESUMEN

I.B.T. Alí Francisco Citalán Madrid

Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina.

Fecha de Graduación: Octubre de 2011 Área de estudio: Terapia Génica.

Candidato para el Grado de Maestría en Ciencias con Orientación Terminal en Biología Molecular e Ingeniería Genética. Número de páginas: 59

Título del Estudio. “GENERACIÓN DE UN VECTOR ADENOVIRAL PARA LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA LA PROTEÍNA *ENV* DEL XMRV (XENOTROPIC MURINE LEUKEMIA VIRUS-RELATED VIRUS)”.

Antecedentes: El XMRV es un *gammaretrovirus* que se le ha asociado al cáncer de próstata (CaP) y al síndrome de fatiga crónica (CFS). La investigación en torno a este retrovirus está basada en ensayos de PCR para la detección de sus ácidos nucleicos y de sus proteínas mediante anticuerpos. Dada la relevancia que tienen los anticuerpos como herramientas de investigación básica, es importante contar con este tipo de reactivos que coadyuven en la investigación y para ampliar nuestro conocimiento respecto a este nuevo retrovirus.

Objetivo: Generar anticuerpos policlonaes contra la proteína *env* del XMRV mediante la inmunización de conejos con vectores adenovirales.

Materiales y Métodos: Se generó el pAdCMV-*envX* por recombinación homóloga entre los vectores pShuttleCMV-*envX* y pAdEasy-1. Las partículas virales se produjeron en las células HEK293, se cosecharon y titularon en placas (TCID₅₀). Tres conejos hembras blancos Nueva Zelanda previamente sangrados fueron inmunizados con el AdCMV-*envX* expresando la proteína *env* del XMRV. Seis y ocho semanas después de la primera dosis se hizo una inmunización de refuerzo y dos semanas más tarde se hizo una sangría total para cada animal. Los sueros preinmunes e inmunes fueron utilizados en ensayos de Western blot e inmunocitoquímica

Resultados. Se generó el pAdCMV-*envX* que expresa la proteína *env* del XMRV y fue caracterizado con *Bam*HI, PCR o secuenciación. Los vectores adenovirales producidos se caracterizaron por PCR, se purificaron y titularon obteniendo 1×10^{10} PFU/mL. El suero inmune del conejo 2 produjo una reacción positiva contra *env* en el extracto de células 22Rv1. Los sueros preinmunes e inmunes generaron una reacción inespecífica contra los extractos de células 22Rv1 y de PC-3 infectadas con Ad5-WT. En los ensayos de inmunocitoquímica, los sueros inmunes presentaron reacción contra las proteínas de las células 22Rv1 al igual que el suero control y no así con el control negativo. Sin embargo los sueros preinmunes produjeron reacción contra las proteínas, aunque en menor intensidad.

Discusión. La reacción generada con el suero del conejo 2 indica que se está generando una respuesta inmune contra el antígeno. La dosis para el conejo 1 fue insuficiente para generar una respuesta inmune contra el antígeno. Las respuestas obtenidas con los sueros de los conejos 2 y 3 inmunizados con

dosis iguales indican que hay variación individual. La reacción producida con los sueros inmunizados en los extractos de las células 22Rv1 y PC-3 transducidas con el Ad5-WT puede deberse a que los conejos fueron inmunizados con vectores adenovirales. El patrón de bandas generado por la reacción con los sueros preinmunes podría deberse a que los animales estuvieron expuestos a algún agente adenoviral propio de los conejos. La reacción generada por los sueros preinmunes en las inmunocitoquímicas podría deberse a una exposición de los conejos a retrovirus. Se debe replantear el procedimiento utilizado para la generación de un suero policlonal a partir de la inmunización de animales con vectores adenovirales.

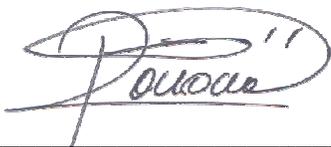
Conclusiones: Se generó y produjo el vector adenoviral que expresa la proteína *env* del XMRV. Se obtuvo un suero que produjo una respuesta positiva contra *env* del XMRV. En los estudios de Western blot, los sueros inmunes y preinmunes de los conejos produjeron reacción para los lisados de las células 22Rv1 y PC-3 infectadas con el Ad5-WT. En los estudios de inmunocitoquímica, los sueros inmunes y preinmunes de los conejos produjeron reacción contra las proteínas de las células 22Rv1. La débil respuesta y la poca especificidad contra el antígeno exhibida por el suero inmunizado del conejo 2 sugieren que este no es el mejor método para la producción de un suero policlonal.

DIRECTOR DE TESIS



DR. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS



DRA. ROCÍO ORTIZ LÓPEZ

CO-DIRECTOR DE TESIS



DRA. MA. DE LOS ÁNGELES CASTRO CORONA

LISTA DE FIGURAS

FIGURAS	PÁGINA
1. La vía 2-5A/RNasa L	3
2. Diagrama de la RNasa L humana	4
3. Modos posibles de oncogénesis del XMRV	7
4. Estructura del XMRV	11
5. Filogenia del XMRV	12
6. Microscopía del XMRV	12
7. Mapas de los plásmidos pShuttle-CMV, pAdEasy-1 y pCR2.1TOPO	25
8. Estrategia general	28
9. Estrategia para la producción de AdCMV-envX	29
10. Cronograma de inmunizaciones	32
11. Amplificación por PCR para <i>env</i>	34
12. Caracterización de pCR2.1-TOPO-env con la enzima <i>EcoRI</i>	34
13. Esquema de la secuenciación realizada	35
14. Análisis de restricción para pShuttleCMV-envX con las enzimas <i>EcoRI</i> , <i>KpnI</i> y <i>HindIII</i>	36
15. Análisis de restricción para pShuttleCMV-envX con la enzima <i>HindIII</i>	36
16. Caracterización por PCR de pAdCMV-envX	37
17. PCR para <i>env</i> a partir de cDNA	37
18. PCR para <i>env</i> a partir del cDNA de células transducidas con el AdCMV-envX.	38
19. Células HEK293 transfectadas con pAdCMV-envX y sin transfectar	39

20. PCR a partir del DNA del vector adenoviral	39
21. Western blot para los sueros del conejo 1	41
22. Western blot para los sueros del conejo 2	41
23. Western blot para los sueros del conejo 3	41
24. Western blot para el suero inmune del conejo 2 con un nuevo anticuerpo secundario	42
25. Ensayo de inmunocitoquímica con los sueros de los tres conejos	43

LISTA DE TABLAS

TABLAS	PÁGINA
1. Ventajas y desventajas de los anticuerpos policlonales	19
2. Dosis de vectores adenovirales y número de animales utilizados	32
3. Oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la secuenciación de <i>env</i>	35

LISTA DE ABREVIATURAS

Ad	Adenovirus
ATP	Trifosfato de adenosina (siglas en inglés)
CFS	Síndrome de fatiga crónica (siglas en inglés)
CaP	Cáncer de próstata
CMV	Citomegalovirus
cm ²	Centímetro cuadrado
DAB	Diaminobencidina
DNA	Ácido desoxiribonucleico (siglas en inglés)
DHT	Dihidrotestosterona
ELISA	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (siglas en inglés)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
HIV-1	Virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (siglas en inglés)
HPR	Peroxidasa de rábano
HPC-1	Cáncer de próstata hereditario tipo 1 (siglas en inglés)
INF	Interferón
kDa	Kilodalton
LTR	Repetición terminal larga (siglas en inglés)
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mM	Milimolar
OAS	Oligoadenilato sintetasa
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (siglas en inglés).

PFU	Unidades formadoras de placa (siglas en inglés)
RNA	Ácido ribonucleico (siglas en inglés)
TCID ₅₀	Dosis letal mínima infecciosa (siglas en inglés)
XMRV	Virus xenotrópico relacionado al virus de la leucemia de ratón (siglas en inglés)
XPR-1	Receptor de retrovirus xenotrópicos y politrópicos tipo 1 (siglas en inglés)

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Los retrovirus abarcan un grupo diverso de patógenos que causan enfermedades en humanos y animales y se les ha asociado a numerosos desórdenes inmunológicos y neurológicos en los mismos. Los retrovirus se han encontrado en cultivos de tejidos humanos, algunos de los cuales han resultado ser contaminantes y otros permanecen en la controversia y sin ser confirmados [1].

Recientemente, se reportó un nuevo retrovirus denominado XMRV (Xenotropic Murine Leukemia Virus-Related Virus) por su similitud con los retrovirus de la leucemia del ratón y a varios retrovirus endógenos del mismo [2]. Este retrovirus, se le ha asociado al cáncer de próstata familiar tipo 1 (HPC1) [2] y al síndrome de fatiga crónica (CFS) [3]. Sin embargo, la evidencia acumulada es inconclusa y contradictoria, por lo que faltan más estudios epidemiológicos y una prueba que defina con certeza el papel del virus en estas dos enfermedades. Parte de la controversia se debe a que los métodos de detección no han sido eficientes y tampoco reproducibles por otros laboratorios. Ciertamente, los estudios llevados a cabo en Estados Unidos sobre el XMRV no han podido ser reproducidos en Europa o en los países donde se han realizado estudios de este nuevo retrovirus o en el mejor de los casos solo se ha reportado una incidencia muy baja del mismo [4-9].

La detección del XMRV está basada en su RNA y en sus proteínas. Sin embargo, las técnicas de PCR para su detección son susceptibles de contaminación. Recientemente, se ha demostrado que en varios estudios que mostraban asociación del XMRV con el CaP o CFS, los reactivos [10], las muestras de sangre y tejidos [11-13], así como líneas celulares tumorales infectadas con el XMRV u otros retrovirus relacionados están contaminados con ácidos nucleicos de ratón [14]. Un problema adicional es, determinar si el XMRV es un virus real, debido a que la línea celular de próstata 22Rv1 que posee varias copias del XMRV en su genoma fue propagada en ratones desnudos, generando la posibilidad de una inserción cromosomal [15], ya que se sabe que los ratones poseen copias de retrovirus endógenos dispersos en su genoma.

Por su parte, la utilización de anticuerpos para la detección del XMRV ha sido poco explorada, debido a que en la mayoría de los estudios se carece de un anticuerpo específico contra el XMRV por lo que no están disponibles en el mercado. Por esta razón es importante contar con anticuerpos específicos, no solo para coadyuvar y complementar los ensayos basados en PCR, sino para disminuir, en la medida de lo posible, los riesgos de contaminación.

1.1. La vía antiviral 2-5A/RNasa L y el XMRV

El XMRV es un gammaretrovirus de reciente descubrimiento que fue aislado de tejidos de próstata de pacientes con cáncer familiar hereditario (HPC1) con una

deficiencia en el gen *RNASEL* [2]. Este gen codifica la enzima RNasa L que se encuentra relacionada con la respuesta antiviral regulada por interferón (INF) y que es activada por la 2-5A sintetasa por medio de ATP, conocida como la vía antiviral 2-5A/RNasa L (Figura 1) [16].

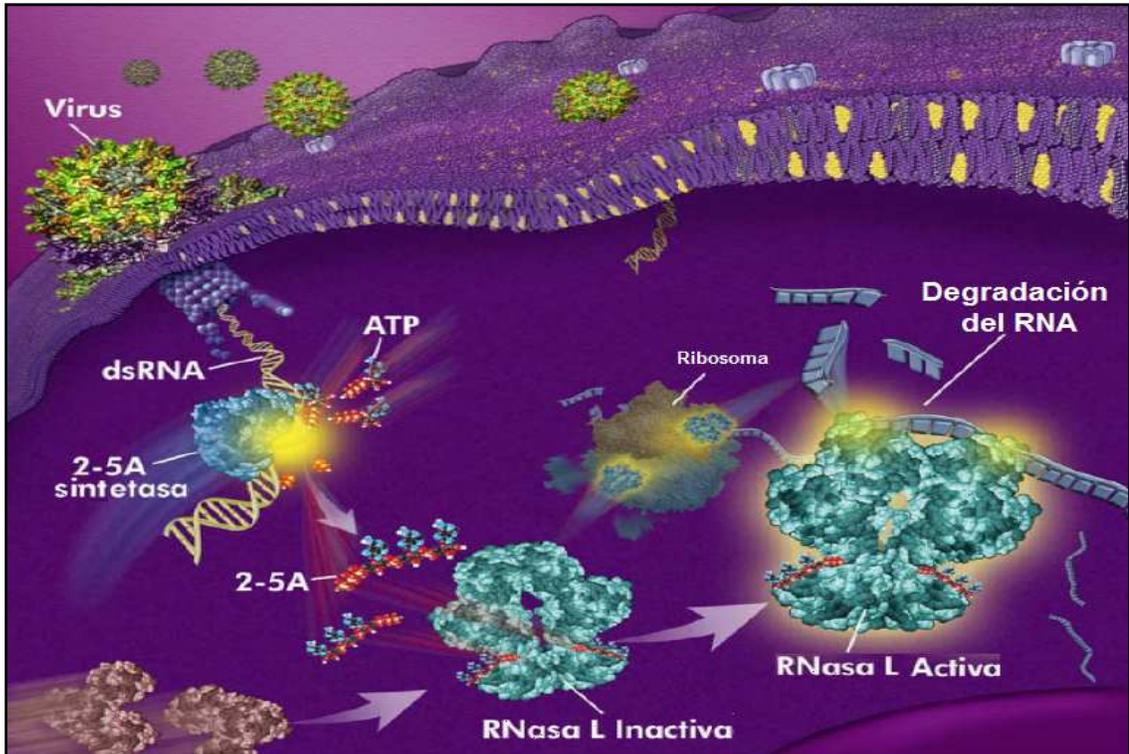


Figura 1. La vía 2-5A/RNasa L. El RNA de doble cadena activa a la 2-5A inducida por INF. Esto resulta en la síntesis de la 2-5A por medio de ATP. La unión de la 2-5A a la forma inactiva de la RNasa L conduce a su activación. La degradación resultante de las regiones de cadena sencilla en el RNA produce una potente respuesta antiviral en las células tratadas con INF y en las infectadas por virus.

Los defectos en el gen *RNASEL* se han vinculado a una mayor susceptibilidad de infecciones por virus y recientemente se le ha asociado como el gen del HPC1 [17-19]. La vía 2-5A/RNasa L además de estar implicada en mediar la apoptosis en respuesta a la infección viral también lo hace en función a varios estímulos externos [16].

Las mutaciones del gen RNASEL en hombres con cáncer de próstata (CaP) incluyen aquellas encontradas en los dominios: regulatorio (activación/represión), de nucleasa (catálisis) y el de dimerización (tipo cinasa) (Figura 2) [18]. Sin embargo, una de estas mutaciones, en particular la R462Q localizada en el dominio de dimerización está implicada en 13% de los casos de CaP [19], por lo que esta variante bien podría ser un importante marcador de riesgo para este cáncer [17]. Previamente, se ha descrito la importancia de la variante R462Q de la enzima RNasa L y el aumento en el riesgo de desarrollar CaP hasta en ~1.5 veces para el genotipo RQ (heterocigótico), mientras que el poseer dos alelos mutados (QQ) incrementa el riesgo al doble [18].

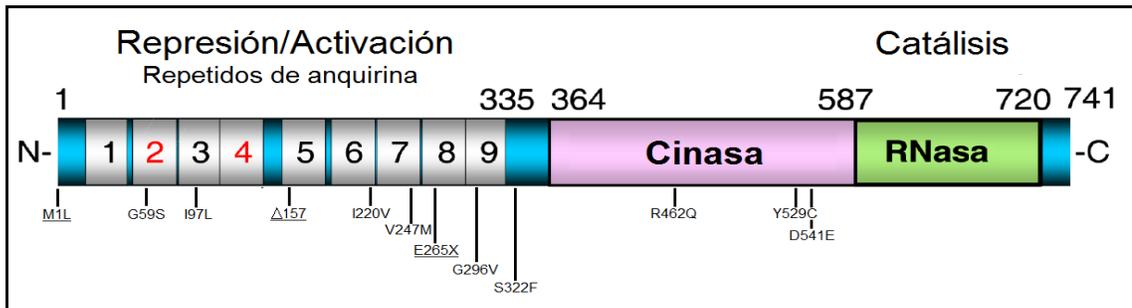


Figura 2. Diagrama de la RNasa L humana. Se muestran las mutaciones que ocurren así como de sus variantes. Las mutaciones con inactivación de la enzima están subrayadas.

1.2. El XMRV y el cáncer de próstata (CaP)

El hallazgo de que el HPC1 está vinculado al gen RNASEL y que los defectos heredados en la RNasa L podrían permitir la infección por virus oncogénicos motivó la búsqueda de los agentes causales del CaP. En el año 2006, Urisman

y cols., mediante un estudio de microarreglos con el DNA de familias de virus conocidos lograron la identificación del XMRV en muestras de tejidos de pacientes con HPC1 con genotipo QQ de la RNasa L. Ellos observaron una correlación entre la presencia del virus y el genotipo de los pacientes con CaP, siendo más frecuente en individuos con genotipo QQ que los genotipos heterocigoto y nativo (QR y RR, respectivamente) [2].

Recientemente, se aisló el XMRV a partir de la línea de carcinoma celular de próstata 22Rv1, la cual reveló la integración de copias múltiples de este virus debido a un posible efecto oncogénico por activación insercional. Sin embargo, esto pudiera deberse a una posible expansión clonal de la línea celular en lugar de un efecto directo relacionado con el virus [15].

También se ha determinado que los sitios de integración del XMRV en la línea celular de próstata DU145 incluyen sitios de inicio de la transcripción, islas CpG, sitios hipersensibles a DNAsas y regiones densas en genes; el análisis en tejidos de cáncer de próstata demostró una preferencia similar y de genes relacionados con el cáncer; aunque esto evidenció un posible proceso que favorece la inserción cromosomal. Ni en las células infectadas ni tampoco en los tejidos analizados se encontró evidencia de integración cerca de protooncogenes o de genes supresores de tumores [20].

El análisis de 233 muestras de tejidos de pacientes con CaP y de 101 controles con hiperplasia benigna de próstata reveló mediante qPCR la presencia de DNA

de XMRV en 6% de las muestras con cáncer y de 2% de los controles analizados. Un segundo análisis realizado mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo anti-XMRV identificó proteínas del virus en 23% de las muestras con CaP y 4% de los controles, preferentemente expresadas en las células epiteliales del tejido maligno (85%). No se encontró asociación entre la presencia del virus y el genotipo, pero se observó un vínculo entre el grado del tumor y la presencia del virus [21].

Aunque la presencia del virus ha sido confirmada en algunos estudios, otros han descartado su presencia. Los análisis por qPCR, PCR anidada y ELISA llevados a cabo por un grupo alemán sobre 589 muestras de CaP no detectaron presencia del XMRV. Cabe mencionar que 12.9% de las muestras revelaron un genotipo QQ [22]. Así también, el análisis de 170 muestras de tejido de CaP por medio de PCR no reveló presencia del XMRV y en cambio sí la presencia de DNA bacteriano (87% de las muestras analizadas). La evidencia histológica tampoco mostró presencia de inflamación aguda o crónica [23].

El XMRV se ha detectado en células del estroma de los tejidos de cáncer de próstata, lo que hace suponer una vía indirecta de tumorigénesis (Figura 3) [24]. Sin embargo, estudios posteriores han detectado tanto DNA como proteínas de este retrovirus en las células del epitelio de tejidos con cáncer, lo que involucraría un mecanismo directo de tumorigénesis (Figura 3) [21]. Éste último hecho revela una vía compatible con los mecanismos clásicos de transformación celular por parte de retrovirus oncogénicos.

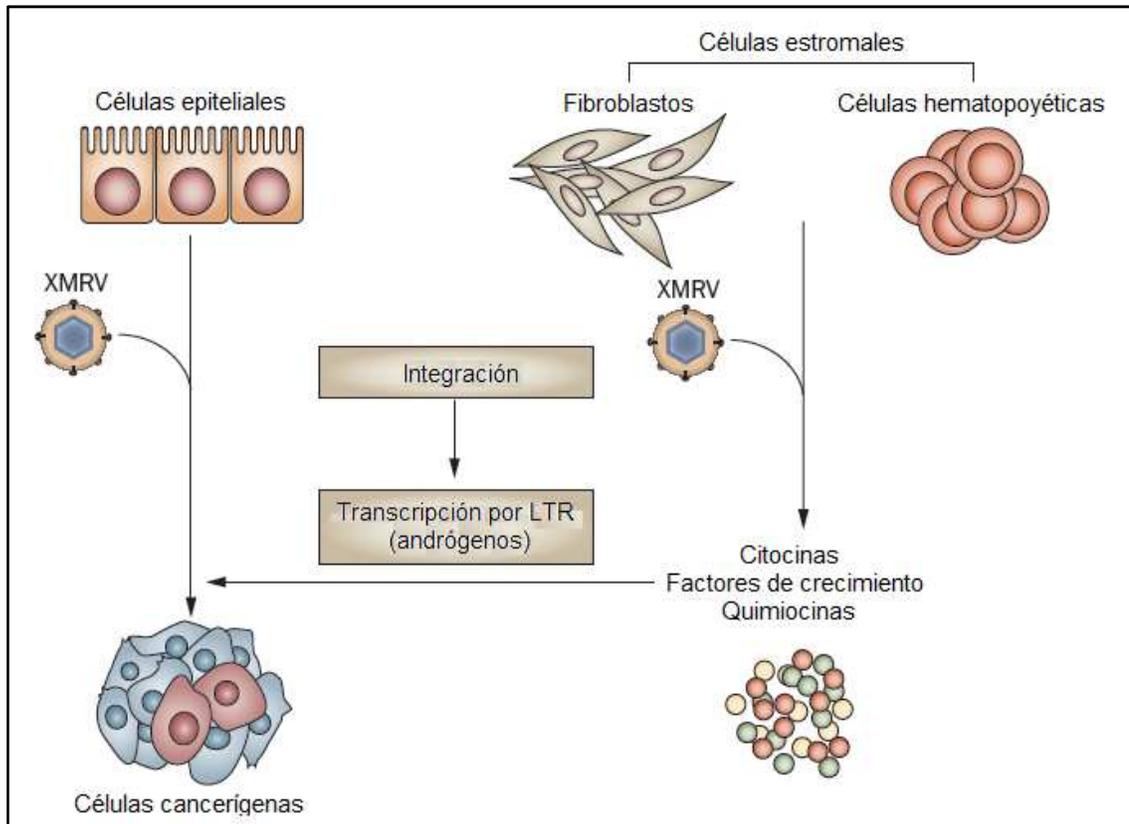


Figura 3. Modos posibles de oncogénesis en la próstata por el XMRV. Cuando las células epiteliales son infectadas por el XMRV, las secuencias LTR podrían ser integradas en oncogenes celulares causando la transformación directa y la expansión clonal. La infección por XMRV de las células estromales pudiera tener un papel indirecto pero activo en la oncogénesis por medio de la producción de citocinas, factores de crecimiento y quimiocinas contribuyendo a los cambios inflamatorios crónicos que preceden y conducen al CaP.

Hasta la fecha no se ha establecido una relación causal entre el XMRV y el CaP y mucho menos se cuenta con un modelo por el cual el XMRV pudiera dirigir la transformación celular. Sin embargo, se ha observado que la infección por XMRV es más eficiente en la línea celular de cáncer LNCaP comparada con las líneas celulares 293T [21], HeLa (carcinoma cervical humano) y 2fTGH (fibrosarcoma humano), lo que podría deberse en parte a un incremento en el ambiente transcripcional dentro de las células LNCaP permitiendo la producción de más proteínas virales y la subsecuente liberación de sus partículas [25].

A pesar de que este retrovirus posee la capacidad de infectar ciertas líneas celulares, carece de actividad de transformación directa sobre células epiteliales. Sin embargo, algunos eventos excepcionales de transformación han sido observados en la línea de fibroblastos de rata 208F, lo que sugiere que aunque el XMRV carece de actividad de transformación directa, es capaz de activar oncogenes celulares en bajos niveles [26].

Faltan más evidencias epidemiológicas de una asociación del XMRV con el CaP o determinar si solamente es un virus pasajero. Los datos contradictorios de la asociación del XMRV con el CaP subrayan la importancia de establecer y validar los ensayos y los reactivos que detecten de manera precisa la infección por XMRV.

1.3. El XMRV y el síndrome de fatiga crónica (CFS)

La deficiencia de la enzima RNasa L se ha observado en pacientes con síndrome de fatiga crónica (CFS), que por muchos años ha sido atribuido a alteraciones psicológicas por parte del paciente más que a un determinado agente causal. Sin embargo, se ha observado la infección oportunista por parte de virus en pacientes con esta afección, así como alteraciones en el perfil de citocinas, descenso en la función de las células NK (*natural killer*), presencia de autoanticuerpos y una reducida respuesta de las células T a los mitógenos y de antígenos específicos [27]. Esta activación crónica del sistema inmune y la

observación de la proteólisis de la RNasa L en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) en pacientes con CFS motivó la búsqueda del agente causal de esta enfermedad.

Un estudio reciente mediante PCR anidada encontró DNA y proteínas del XMRV en PBMCs de 67% de pacientes con CFS analizados, comparado con 8% de los controles sanos [3]. Recientemente, se encontró evidencia de la secuencia del gen *gag* de un virus relacionado al MLV en muestras de DNA en PBMCs de 86.5% de 37 pacientes con CFS analizados y en 6.8% de los controles. A diferencia de lo ya reportado, se encontró evidencia de un grupo genéticamente diverso de virus relacionados al MLV más que a los del XMRV. Sin embargo, este estudio no constituye una prueba definitiva de infección viral [28].

La posible asociación de un agente etiológico viral al CFS, especialmente el XMRV no ha sido claro debido a que varios estudios no han podido detectar el virus. Un estudio realizado en Reino Unido con 186 pacientes diagnosticados con CFS mediante PCR anidada no encontró evidencia alguna del XMRV ni de otros virus relacionadas al MLV, debido posiblemente a una diferencia entre la población europea y la estadounidense, donde en última instancia se ha hallado evidencia del virus [5].

Un estudio mediante qPCR con 170 muestras de pacientes con CFS y 395 casos controles no encontró asociación alguna entre el virus y la enfermedad.

No obstante, se observó actividad neutralizante del plasma para el XMRV en cuatro muestras del total de la población control analizada. Esto indicaría que la infección por el XMRV pudiera ocurrir en la población general [4]. Estudios similares llevados a cabo en Holanda no apoyan en lo absoluto una asociación entre el XMRV y el CFS, y tampoco una relación directa como agente causal de esta enfermedad [29].

Los estudios en torno al XMRV y su asociación con el CFS no fortalecen en nada su participación en esta enfermedad y sí plantean más preguntas que respuestas [30]. El vínculo entre la infección por XMRV y el CFS es actualmente controvertido y requiere de una mayor investigación, teniendo en cuenta el impacto potencial que puede tener en el diagnóstico y tratamiento de esta enfermedad [24].

1.4. Biología y patofisiología del XMRV

El XMRV posee un genoma doble de RNA de cadena sencilla y polaridad positiva con una longitud total de 8,185 nucleótidos. Este gammaretrovirus se transcribe en una sola cadena de RNA que se traduce en los polipéptidos que dan origen al núcleo viral (*gag*); proteasa, transcriptasa reversa e integrasa (*pol*). Así también, el RNA del retrovirus por un proceso de corte y empalme alternativo da origen al polipéptido precursor de la envoltura (*env*) (Figura 4) [31].

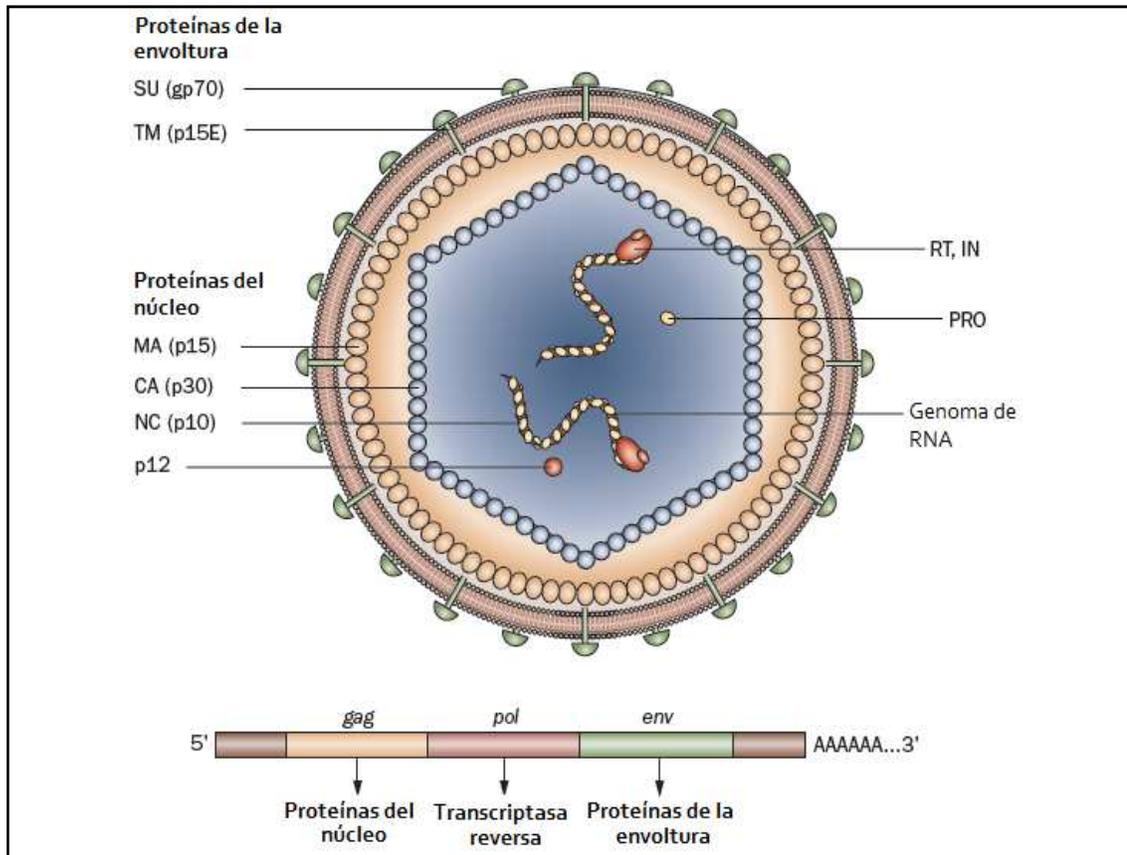


Figura 4. Estructura del XMRV. El diagrama muestra las proteínas del núcleo viral del gen *gag* (matriz, MA; cápside, CA; nucleocápside, NC y p12); del gen *pol* (proteasa, PRO; transcriptasa reversa, RT e integrasa, IN) y las proteínas de la envoltura (subunidad de superficie, SU y transmembrana, TM) del gen *env*.

El XMRV se encuentra relacionado a los virus de la leucemia de ratón (MLV) y a algunos retrovirus endógenos (mERV) del mismo [2, 31] (Figura 5). Varias de las proteínas del XMRV poseen pesos moleculares similares a aquellas encontradas en el virus de la leucemia de ratón de Moloney (MoMLV). Esto hace que dichas proteínas estén estructural y funcionalmente relacionadas y por lo tanto que su procesamiento y ensamblaje sean similares. El análisis mediante microscopía electrónica, muestra que las partículas del XMRV tanto en su forma madura como inmadura son típicas de un retrovirus tipo C, lo que apoya su clasificación dentro de este grupo (Figura 6) [21].

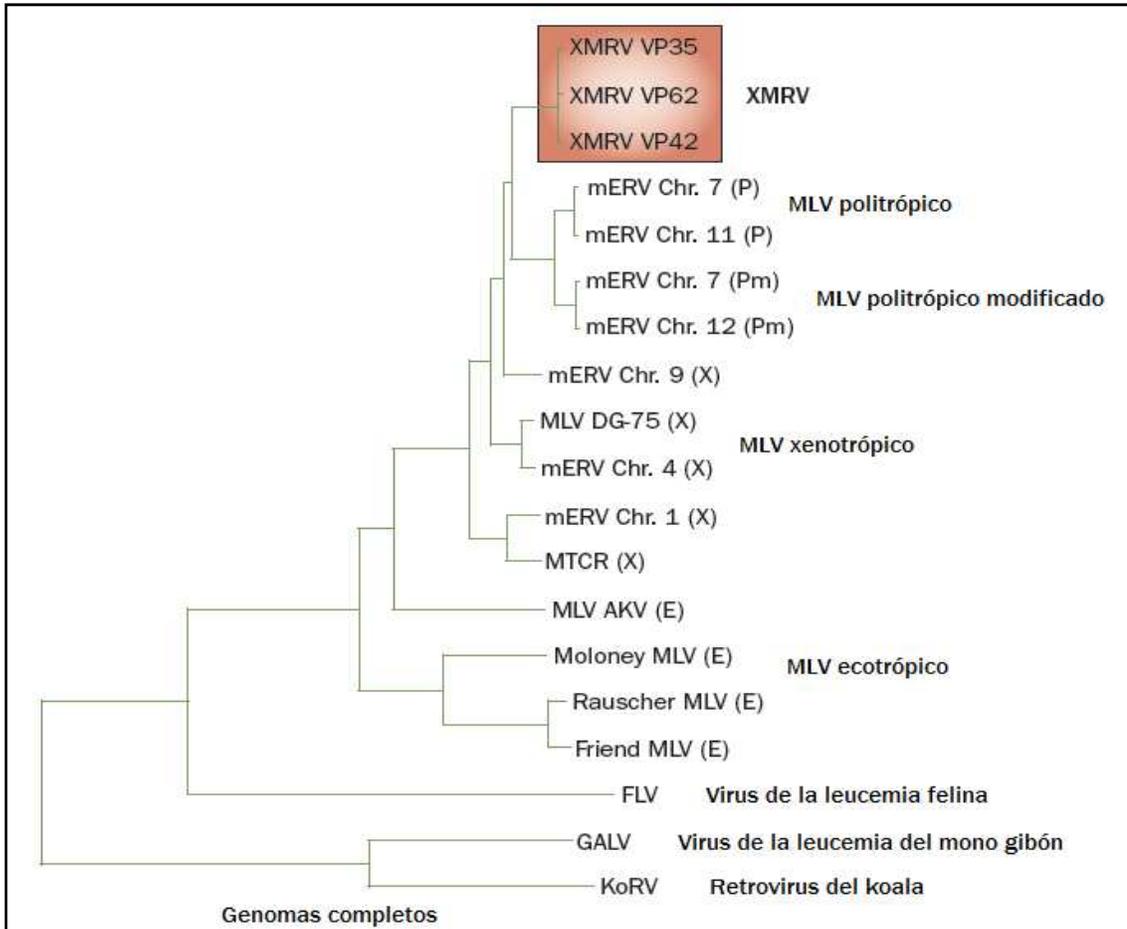


Figura 5. Filogenia del XMRV. Se muestra una comparación de nucleótidos de las cepas VP35, VP42 y VP62 clonados de tumores de próstata, MLV DG-75, MTCR y virus no ecotrópicos representativos. (X) xenotrópico, (P) politrópico, (Pm) politrópico modificado, (E) ecotrópico. Abreviaciones: mERV, secuencias retrovirales endógenas murinas, un conjunto representativo de provirus no ecotrópicos; MLV, virus de leucemia de ratón; MTCR, retrovirus tipo c de ratón; XMRV, virus xenotrópico relacionado al de leucemia de ratón.

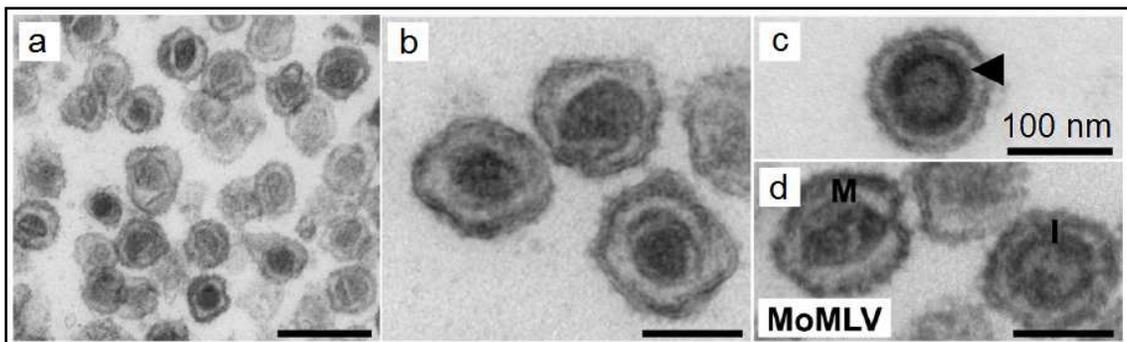


Figura 6. Microscopía electrónica de transmisión del XMRV. Partículas virales del XMRV a); núcleos maduros del XMRV b); núcleos inmaduros del XMRV c) y partículas inmaduras (I) y maduras (M) del MoMLV d).

1.4.1. Infectividad y tropismo del XMRV

El XMRV es xenotrópico porque es similar a los virus de la línea germinal de ratones, pero sus proteínas de envoltura no poseen un receptor que las células murinas aún conservan. Aunque el virus no se puede reproducir en ratones, este se puede unir a los receptores de membranas celulares de otras especies, incluyendo a la humana [32].

Los retrovirus xenotrópicos y los politrópicos emplean XPR1 como su receptor de entrada. En efecto, el XMRV es incapaz de infectar la línea celular CHO que carece de este receptor [33]. Sin embargo, la expresión transitoria del receptor XPR1 de humano favorece la infección por parte del XMRV, demostrando que es un cofactor para la infección y muy posiblemente funcione como un receptor para el XMRV [34].

El XPR1 es ampliamente expresado en la superficie de células de roedores y otros mamíferos, cuyas variantes pueden influenciar la transmisión entre especie de retrovirus xenotrópicos y politrópicos. El XPR1 de roedores está bajo selección positiva lo que indica una historia de conflictos entre el hospedero y el patógeno. No todos los mamíferos no roedores son susceptibles a los MLVs xenotrópicos, pero algunos pueden restringir otros miembros de la familia MLV xenotrópicos y politrópicos. De esta manera la resistencia de las células de hámster a la infección por XMRV indica que este virus tiene requerimientos únicos de receptores [35].

Si bien es cierto el papel preponderante que tiene este receptor en el tropismo del XMRV, como lo demuestra la infección de línea celulares de fibroblastos por medio de XPR1, el XMRV es capaz de infectar líneas celulares del músculo liso y epitelial prostático que no necesariamente expresan este receptor. Es posible que junto al XPR1 existan determinantes celulares adicionales requeridos para la entrada del XMRV en diferentes células de próstata humana *in vitro* [36].

La aparente asociación del retrovirus con el CaP podría explicarse por los elementos regulatorios presentes en la región U3 de la LTR-5' conteniendo varios elementos potenciadores que regulan su transcripción [24]. Uno de estos, es un elemento de respuesta a glucocorticoides (GRE) que se encuentra conservado entre los diferentes aislados del XMRV [2]. El GRE actúa como un potenciador que activa la transcripción en respuesta a varias hormonas esteroides incluyendo glucocorticoides, mineralocorticoides, progesterona y andrógenos. Dado el papel que tienen los andrógenos en el desarrollo, crecimiento y mantenimiento de la próstata, es posible suponer que la orientación del XMRV hacia la próstata pueda deberse a la capacidad de los andrógenos de estimular la transcripción del XMRV [24].

El análisis del efecto de la dihidrotestosterona (DHT) sobre la transcripción y replicación del XMRV corrobora esta hipótesis. La transcripción de la región U3 del XMRV resultó estimulada doblemente por medio de la DHT. Las mutaciones en el GRE del XMRV dañaron la transcripción basal y la respuesta a andrógenos. La DHT fue capaz de estimular la replicación del XMRV hasta tres

veces, mientras que los inhibidores de andrógenos como *casodex* y *flutamida* suprimieron el crecimiento del virus; estos descubrimientos sugieren que la integración de la LTR del XMRV en el DNA del hospedero podría alterar la estimulación por andrógenos sobre el crecimiento celular [37].

El XMRV, como ya fue descrito, tiene la capacidad de infectar diferentes líneas celulares, a pesar de ello, solo ha sido detectado tanto en el tejido epitelial como en el estromal de los tejidos de cáncer de próstata, así como en PBMCs de pacientes con CFS [38], aunque no en todos y aún en proporciones diferentes. La cierta restricción viral observada del virus no puede ser completamente explicada en función de la LTR o del receptor de entrada XPR1, por lo que ciertos factores celulares deben estar involucrados. Uno de estos factores, es la familia de proteínas Apobec3 que juega un papel importante en el tropismo celular mediando la infección *in vivo* y la dispersión de los virus. Por ejemplo, la proteína Apobec3G (A3G), un factor con una potente actividad antiviral contra la mayoría de los retrovirus, reduce de manera eficiente la infectividad del XMRV [39].

1.4.2. Modos hipotéticos de transmisión del XMRV

Hasta la fecha no se cuenta con un esquema detallado sobre la vía de infección del XMRV. Sin embargo, la evidencia recabada sugiere que este virus se trasmite a través de la sangre dado que en un principio el XMRV se encontró en

una pequeña población de células hematopoyéticas estromales [2] y en PBMCs de pacientes con CFS [3].

También se ha sugerido que el XMRV se transmite sexualmente. El RNA del XMRV ha sido detectado en 13% de secreciones prostáticas analizadas de hombres con CaP. Además, la infectividad del XMRV en células prostáticas primarias se ve incrementada en presencia del potenciador derivado del semen de infección por virus (SEVI) presente en el semen humano [40]. A pesar de ello, el análisis de 93 muestras de plasma seminal de hombres infectados con HIV-1 mediante PCR anidada no encontró evidencia alguna del retrovirus XMRV [6].

De manera reciente, el XMRV fue detectado en secreciones del tracto respiratorio de 3.2% de individuos inmunocompetentes y en 10% de inmunocomprometidos analizados, generando la posibilidad de una transmisión del virus a través del tracto respiratorio [41].

A pesar de que se desconoce el modo exacto de infección por parte del XMRV, ya se han evaluado algunas opciones terapéuticas contra este virus basadas en el conocimiento farmacológico que se tiene sobre el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (HIV-1). Por ejemplo, AZT, que es un potente inhibidor de la actividad de transcriptasa reversa es capaz de bloquear la replicación *in vitro* del XMRV [24]. De manera similar, el inhibidor de la integrasa, *raltegravir* es también eficiente en bloquear su replicación [42].

Actualmente se discute si el XMRV podría ser un agente causal de CaP y CFS, debido a la demostración de contaminación con ácidos nucleicos de retrovirus en estudios donde se habían reportado la detección del XMRV. Tres son las posibles causas de de contaminación en el proceso de detección del XMRV: ácidos nucleicos de retrovirus de ratón presentes en reactivos comerciales para PCR [10]; trazas de DNA genómico de ratón en sangre humana [11] y tejidos [13] y DNA o RNA de ratón en líneas celulares tumorales infectadas con XMRV u otros gammaretrovirus cercanamente relacionados [43]. Mientras que el XMRV no demuestre ser agente causal de enfermedad, las posibilidades de diagnóstico más eficaces y el tratamiento o prevención seguirán siendo distintas [31]. Por último, si existe suficiente riesgo de enfermedad causada por el XMRV, el análisis de sangre para la prevención de la infección mediante transfusiones o trasplantes con el tiempo podría considerarse prudente y hasta necesario [31, 44].

1.5. Las herramientas de investigación para el XMRV

La investigación actual en torno al nuevo retrovirus XMRV esta principalmente dirigido a la detección del RNA y de sus proteínas. El método preferente de detección en especímenes de tejidos de próstata con cáncer así como en sangre, como en el caso de pacientes con CFS, está basado en la PCR en sus diferentes modalidades, es decir PCR anidada, RT-PCR y qPCR o diferentes combinaciones de las mismas. Así también, el estudio y detección de los

antígenos del XMRV, están basados en la utilización de anticuerpos policlonales y monoclonales. Hasta la fecha, son pocos los estudios que destacan el uso de esta herramienta en la detección del retrovirus. De manera reciente, se ha reportado el uso de anticuerpos anti-XMRV para la detección de los antígenos virales en tejidos con cáncer y en muestras de sangre [2, 3, 21]. En conjunto, este tipo de herramientas provee un análisis más sensible y detallado y una mayor certeza en la detección del virus.

Los anticuerpos resultan ser herramientas valiosas en el laboratorio y en lo clínico, han llegado a ser instrumentos esenciales en la investigación inmunológica y en el examen diagnóstico. Actualmente no se encuentra en el mercado un anticuerpo anti-XMRV. Los beneficios de contar con un reactivo de este tipo en el laboratorio son enormes, generando la posibilidad de ampliar nuestro conocimiento del XMRV.

1.5.1. Generación de anticuerpos policlonales

La generación de una gran cantidad de anticuerpos específicos dirigido contra una proteína o péptidos de interés es esencial para el éxito dentro de la investigación básica y dentro de los programas de investigación aplicada. Los anticuerpos policlonales derivados de animales inmunizados con proteínas purificadas o péptidos son particularmente valiosos para el uso en el laboratorio [45]. Los anticuerpos policlonales detectan una multiplicidad de epítopes y por

lo tanto reconocen antígenos desde diferentes orientaciones [46]. Además, los anticuerpos policlonales son relativamente baratos y simples de producir a corto plazo en comparación con los anticuerpos monoclonales. Así también, el uso de animales grandes (como caballos, cabras o conejos) permite la recuperación de un gran volumen de suero con anticuerpos [46] (Tabla 1).

Tabla 1. Ventajas y desventajas de los anticuerpos policlonales.

<i>Ventajas</i>	<i>Desventajas</i>
Detectan una multiplicidad de epítopes, por lo que reconocen un antígeno desde diferentes orientaciones.	La producción de anticuerpos policlonales varía de un lote a otro. Variación en la reactividad y título del anticuerpo policlonal.
Son fáciles, económicos y rápidos de producir en comparación con los anticuerpos monoclonales.	Los anticuerpos policlonales generados para el mismo antígeno usando diferentes animales difieren entre estos, así como en su avidéz, la cual cambia en función del tiempo.
El uso de animales grandes (e.g. cabras, caballos o conejos) permite la producción de grandes volúmenes de sueros ricos en anticuerpos.	La cantidad de anticuerpos policlonales está limitada por el tamaño y el tiempo de vida del animal.
Son muy estables en un rango amplio de pH y concentraciones de sal.	

1.5.2. Vectores adenovirales en la producción de anticuerpos policlonales

Los vectores adenovirales deficientes en replicación han demostrado su utilidad en la terapia génica, en la terapia de vacunas y en las aplicaciones de biología básica. Varias son las características que hacen de los vectores adenovirales atractivos como vectores de transferencia genética. Por ejemplo, lo altos títulos

de producción y los altos niveles de expresión transgénica logrados en un amplio espectro de células hospederas y tejidos, incluyendo a células en estado quiescente [47, 48], así como la seguridad en los protocolos establecidos para su utilización.

En los últimos años, los vectores adenovirales han evolucionado de ser una herramienta útil en la terapia de reemplazo de genes en el tratamiento de enfermedades genéticas a ser vehículos de liberación de vacunas [49]. Aunque la inmunogenicidad inherente de los vectores adenovirales limita el periodo de efectividad de la terapia genética basada en adenovirus, se han ideado estrategias para superar esta limitante impuesta por el sistema inmune, lo que ha significado el mejoramiento en el desempeño de los vectores adenovirales permitiendo la expansión de su aplicabilidad a otros campos [50].

Los adenovirus recombinantes han sido empleados para desarrollar vacunas contra un número de agentes infecciosos. Estos expresan proteínas recombinantes, incluyendo cualquier modificación postraduccional en la misma forma como lo hace la proteína nativa en modelos animales abortivos y permisivos [51].

La utilidad de los vectores adenovirales se ha visto reflejada en los esquemas de inmunización para la generación de anticuerpos contra antígenos específicos. La utilización de este enfoque ha sido ensayada ya desde hace algunos años, demostrando que la utilización de vectores adenovirales

acarreado un antígeno específico, como por ejemplo la proteína β -galactosidasa, son capaces de generar una respuesta humoral y celular a largo plazo y sostenida [52]. Por otro lado, la generación de adenovirus recombinantes (rAd5) ha demostrado inducir una fuerte respuesta inmune en virtud de los altos títulos de anticuerpos producidos contra la proteína B5 del virus de la viruela (CPX-B5) acarreado por este vector, [53]. Así también, la vacunación con el vector adenoviral Ad-E2 acarreado la proteína E2 del virus del papiloma de conejo cola de algodón (CRPV) logró eliminar la infección por parte de este virus. Sin embargo, no se observó presencia alguna de anticuerpos anti-E2, lo que sugiere un mecanismo diferente responsable de la eficacia clínica de la vacuna con Ad-E2.[54].

El presente estudio describe la producción de un suero policlonal producido en conejos contra la proteína *env* del XMRV mediante la vacunación con un vector adenoviral. Como ya se ha descrito, la utilización de vectores adenovirales solo ha sido aplicada en los enfoques de vacunación y no propiamente en la producción de anticuerpos. Esto representa el primer paso para demostrar la funcionalidad de los vectores adenovirales en la producción de un suero policlonal contra el antígeno *env* del virus XMRV.

Las proteínas del XMRV, en general son muy similares a las de otros retrovirus y en particular con el MoMLV. No obstante, la proteína de envoltura del XMRV difiere de la de otros retrovirus (solo 66% de similitud) y aún más en la unidad de superficie (SU) de esta proteína (54% de similitud), mostrando una mayor

divergencia evolutiva comparado con las proteínas *gag* o *pol* de retrovirus [21]. Esto lo hace un buen candidato para la producción de un suero policlonal contra este blanco antigénico.

1.6. Justificación

El XMRV ha sido asociado al CaP. El estudio, análisis y diagnóstico del XMRV están basados en ensayos de PCR en sus diferentes modalidades y combinaciones de las mismas enfocadas a detectar RNA y sus antígenos mediante el uso de anticuerpos. La generación de anticuerpos es de vital importancia para complementar los métodos de estudio y detección del virus, los cuales se pueden producir de manera fácil, económica y en un corto tiempo. La producción de un suero policlonal contra la proteína *env* del XMRV constituye el enfoque de esta propuesta.

CAPÍTULO II

OBJETIVOS

2.1. Objetivo general

Generar anticuerpos policlonales contra la proteína *env* del XMRV (*Xenotropic Murine Leukemia Virus-Related Virus*) mediante la inmunización de conejos por medio de un vector adenoviral que expresa este blanco proteico.

2.2 Objetivos específicos

- i) Construir un vector adenoviral que exprese la proteína *env* del XMRV.
- ii) Producir anticuerpos policlonales anti-*env* del XMRV.
- iii) Determinar la especificidad para los anticuerpos anti-*env* del XMRV.

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Material biológico

3.1.1. *Animales de laboratorio*

Tres conejos hembras blancos de la cepa Nueva Zelanda de 2 kg y tres meses de edad fueron donados por la Dra. Eva Ma. Salinas Miralles de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, Ags. Los animales fueron mantenidos en el bioterio de la universidad. Todos los experimentos fueron realizados siguiendo las recomendaciones de la Norma Oficial Mexicana (-062-ZOO-1999) que habla de las especificaciones técnicas sobre la producción y uso de los animales de laboratorio (específicamente en su apartado 5.1, sobre el manejo de roedores).

3.1.2. *Bacterias competentes y líneas celulares*

En el estudio fueron empleadas bacterias competentes *E.coli*-DH5 α , BJ5183 (Stratagene, La Jolla, CA) y Turbo (New England BioLabs®, RU). Se emplearon las líneas celulares HEK293, riñón embrionario humano (ATCC CRL-1573TM); PC3, cáncer de próstata metastásico (ATCC CRL-1435TM); 22Rv1, carcinoma prostático primario; HeLa, adenocarcinoma epitelial de cérvix (ATCC CCL-2TM).

3.1.3. Plásmidos

Se utilizaron los plásmidos pCR2.1 TOPO-TA (Invitrogen, Carlsbad, CA); pShuttle-CMV (Q-Biogene, Carlsbad, CA); pAdEasy-1 (Q-Biogene, Carlsbad, CA), los cuales fueron propagados en bacterias E.coli-DH5 α o Turbo competentes y extraídos por mini o midiprep descritos por Sambrock y Russell (2001). Los mapas de los plásmidos se describen a continuación (Figura 7).

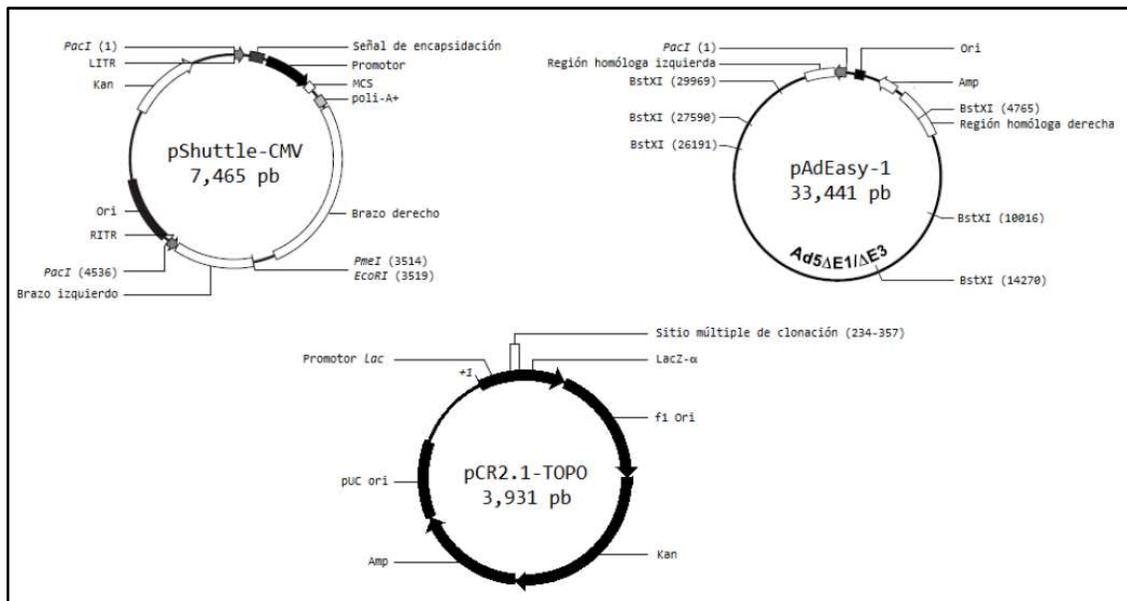


Figura 7. Mapas de los plásmidos pShuttle-CMV, pAdEasy-1 y pCR2.1-TOPO. Estos fueron los plásmidos empleados en el proceso de generación del vector adenoviral AdCMV-envX.

3.1.4. Anticuerpos

Para la realización de los ensayos de Western blot e inmunocitoquímica se utilizaron los anticuerpos secundarios anti-cabra marcado con HPR de pollo

(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anti-conejo marcado con PA o HPR (Invitrogen, Carlsbad, CA); un suero policlonal anti-gp70 de cabra que genera reacción contra la subunidad gp70 de la proteína *env* de retrovirus (Drs. John Elder y David Camerini, Universidad de California, Irvine).

3.2. Materiales y reactivos

En seguida se describen enzimas, reactivos y materiales utilizados durante el proyecto de tesis.

A. New England BioLabs® (Ipswich, RU)

Enzimas de restriction: *EcoRI*, *HindIII*, *KpnI*, *PacI*, *PmeI*, *SmaI*.

B. Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)

Azul de bromofenol; β -mercaptoetanol; cloroformo; cloruro de calcio; cloruro de cesio; cloruro de magnesio; cloruro de potasio; cloruro de sodio; diaminobencidina (3,3'-diaminobencidina); dodecil sulfato de sodio; fenol; formamida; fosfato de sodio; glicina; glucosa; hidróxido de sodio; isopropanol; metanol; Tritón® X-100.

C. Ambresco® (Solon, OH)

Acetato de potasio; agar bacteriológico; extracto de levadura; PBS; triptona caseína; Tris; Tris-HCl.

D. BIO-RAD (Hercules, CA)

Acrilamida; bromuro de etidio; Precision Plus Protein™ All Blue Standards.

E. Invitrogen™ y GIBCO® (Carlsbad, CA)

Agarosa; Lipofectamina™ 2000; medio de cultivo Advanced DMEM; proteinasa K; suero bovino fetal; SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-PCR; Taq polimerasa de DNA; Trizol®.

F. Promega (Madison, WI)

PureYield™ Plasmid Midiprep System; T4 ligasa de DNA; Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP.

G. Corning (Costar City, NY)

Botellas de cultivo celular de 25, 75 y 150 cm²; criotubos de 2.0 mL; pipetas serológicas de 2.0, 5.0, 10.0 y 50.0 mL; placas de cultivo celular de 6 pozos; puntas para pipeta de 20, 200 y 1000 µL; tubos para microcentrifuga de 0.6, 1.6 mL y 2.0 mL; tubos para PCR de 200 µL.

J. Otros

BigDye® Terminator 3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, CA); glicerol (J.T. Baker, México); EDTA (USB™, Cleveland, OH); etanol (Merck, Darmstadt, Alemania); placas de microtítulos (Falcon®, Franklin Lakes, NJ); Slide-A-Lyser® 10 kDa (Thermo Scientific, Waltham, MA); tripsina (Becton Dickinson, Sparks, MD); tubos de polialómero (Beckman, Palo Alto, CA).

3.3. Estrategia general

La estrategia general se encuentra dividida en tres pasos (Figura 8).

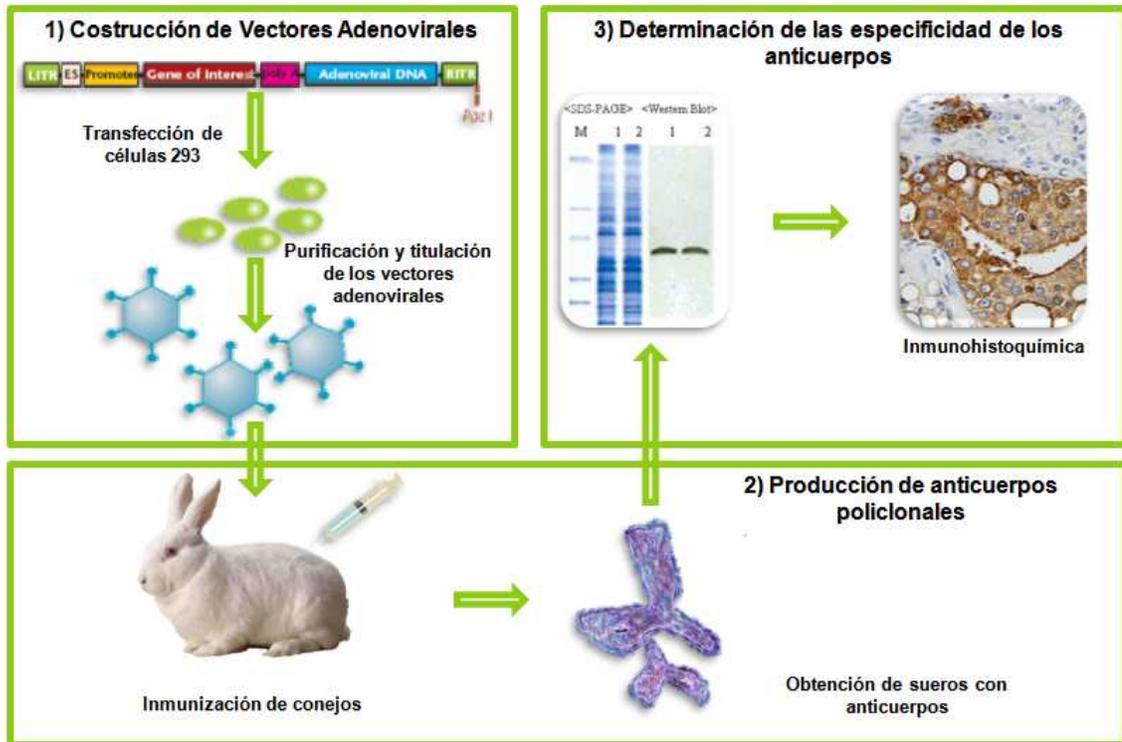


Figura 8. Estrategia general. Diseñada para la generación de anticuerpos policlonales mediante la inmunización con vectores adenovirales recombinantes expresando la proteína *env* del XMRV.

3.3.1. Construcción del pAdCMV-*envX*

Para la generación del vector adenoviral recombinante, se amplificó por PCR a partir del plásmido pXMRV (donado por el Dr. Hun Fang, Universidad de California, Irvine) el fragmento correspondiente a la proteína *env* del XMRV utilizando los oligos: Env-KF 5'–gtcgaccaccatggaaagtccagcggttctc–3' y Env-KR

5'–aagcttttattcacgtgattccacttc–3'. Las condiciones para la PCR fueron 95°C por 5 minutos seguido de 30 ciclos de 95°C por 1 minuto , 72°C por 1 minuto y 60°C por 1 minuto. El fragmento *env* se clonó en el vector pCR2.1-TOPO y se caracterizó por corte con la enzima *EcoRI* y secuenciación. El fragmento *env* fue ligado en el acarreador pShuttle-CMV y caracterizado por corte con las enzimas *EcoRI*, *KpnI* y *HindIII*, posteriormente fue linearizado en el sitio *PmeI* para generar la recombinación homóloga en bacterias *E.coli*-BJ5183 pre-transformadas con el pAdEasy-1. El genoma adenoviral recombinante producido (pAdCMV-envX) fue caracterizado por corte con la enzima *HindIII* y por PCR (Figura 9). Las líneas celulares KEK293 y HeLa fueron transfectadas con el pAdCMV-envX y transducida con el vector adenoviral, respectivamente. Posteriormente, se extrajo el RNA y se sintetizó el cDNA por RT-PCR. Entonces el gen *env* fue amplificado por PCR.

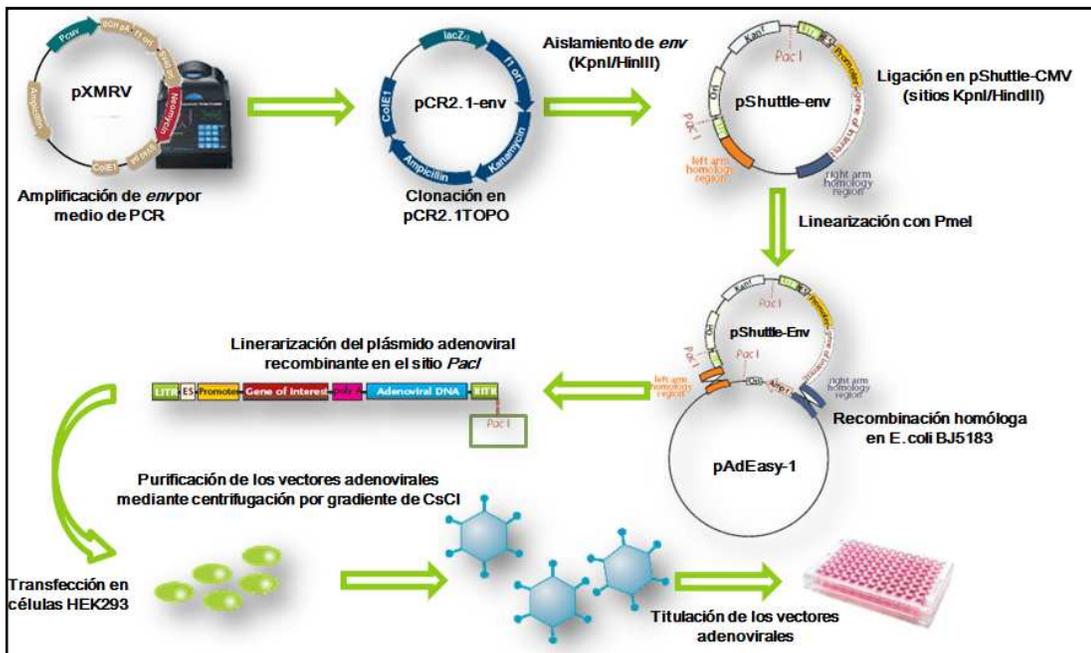


Figura 9. Estrategia para la producción del vector adenoviral recombinante.

3.3.2. Producción del vector AdCMV-envX

La línea celular HEK293 fue transfectada con el plásmido pAdCMV-envX linearizado con la enzima *PacI* mediante lipofectamina siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando se observó efecto citopático, las células fueron cosechadas y lisadas mediante rondas de congelamiento a -70 °C y descongelamiento a 37 °C. Posteriormente, el lisado se utilizó para reinfectar células creciendo en una botella de cultivo T75 a una confluencia de 70-80%. Cuando se observó efecto citopático por virus, las células fueron cosechadas y el lisado utilizado para reinfectar cinco botellas de cultivo T75. Con el lisado celular de estas últimas, diez botellas T75 fueron reinfectadas. A partir del lisado de estas últimas se reinfectaron cincuenta cajas T150. Cuando el efecto citopático fue observado, las células se cosecharon y se procedió a la purificación de los vectores adenovirales.

3.3.3. Purificación del vector AdCMV-envX

La purificación de las partículas virales se realizó mediante centrifugación por gradiente de cloruro de cesio. Las partículas virales fueron separadas del lisado de células mediante un gradiente discontinuo de CsCl de 1.4 y 1.2 g/mL centrifugando a 35,000 rpm durante 2 horas a 4°C. La banda inferior observada en la interfase se recuperó y centrifugo en un gradiente de CsCl de 1.35 g/mL a 35,000 rpm durante 18 horas a 4°C. La banda formada por las partículas virales

fue recuperada y dializada en un Slide-A-Lyzer® 10 kDa durante 1 hora bajo agitación a 4°C en una solución amortiguadora (Tris 10 mM, MgCl₂ 1 mM y NaCl 140 mM), repitiendo dos veces este paso. Por último se realizó una diálisis con solución amortiguadora más 10% de glicerol bajo las condiciones ya mencionadas. El volumen final obtenido se alicuotó en crioviales y se almacenó a -80°C hasta su posterior utilización.

3.3.4. Titulación en placa de AdCMV-envX (TCID₅₀)

En tres placas de 96 pozos se cultivaron 10,000 células HEK293 por pozo en un volumen de 100 µL. Después de 24 horas, filas de 10 pozos con células fueron infectados con diferentes diluciones del vector adenoviral (10⁻⁵-10⁻¹²). Después de 10 días de incubación el efecto citopático fue determinado como la proporción de pozos positivos para cada una de las diluciones.

3.4. Producción de anticuerpos policlonaes contra env del XMRV

Los tres conejos fueron sangrados de la vena marginal de la oreja un día antes de la inmunización. El suero preinmune obtenido se almacenó a -20°C hasta su utilización. Los conejos fueron inmunizados con tres dosis diferentes del vector (Tabla 2). Posteriormente, se hizo una inmunización de refuerzo a las seis semanas para el conejo 1 y 3 y a las ocho semanas para el conejo 2 (Figura

10). Dos semanas después de cada inmunización de refuerzo, se procedió a la sangría total de cada conejo y los sueros obtenidos fueron almacenados a -20°C hasta su utilización.

Tabla 2. Dosis de vectores adenovirales y número de animales utilizados.

Dosis (PFU/mL)	Grupo
1X10 ⁹	Conejo 1
1X10 ¹⁰ , 3.5X10 ⁹	Conejo 2 Conejo 3

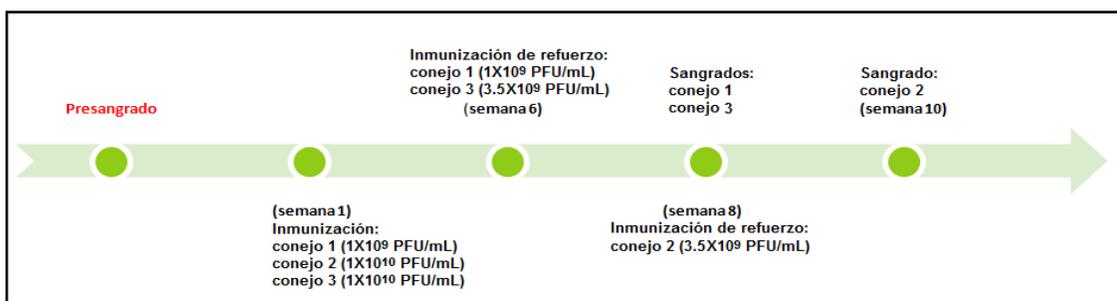


Figura 10. Cronograma de inmunizaciones. Muestra las dosis empleadas y los tiempos requeridos para la producción de un suero policlonal contra la proteína *env* del XMRV producido en conejos por medio de la inmunización con el AdCMV-*env*X

3.5. Evaluación de la especificidad de los sueros obtenidos de conejos

3.5.1. Ensayos de Western blot

La línea celular 22Rv1 y la línea celular PC-3 infectada con el Ad5-WT fueron cultivadas hasta un 80% de confluencia. Posteriormente se realizó una extracción de proteínas de cada una de estas líneas celulares. Los extractos proteicos obtenidos se cuantificaron por el método de Bradford. Cien

microgramos de cada uno de estos extractos se corrieron previa desnaturalización a 100 °C por 5 minutos y 60 °C por 15 minutos en un gel de poliacrilamida al 7.5% a 80 volts durante aproximadamente 1.5 horas. Posteriormente las muestras se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa toda la noche a 12 mAmp en frio y luego se incubaron con los sueros preinmunes o inmunes (1:1000) durante 24 horas a 4°C. Posteriormente, se incubaron con un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con fosfatasa alcalina (PA) o el suero anti-gp70 de cabra marcado con peroxidasa de rábano (HRP) (1:5000). Las muestras se revelaron con diaminobencidina (DAB).

3.5.2. Ensayos de inmunocitoquímica

Células 22Rv1 se cultivaron hasta alcanzar más de 90% de confluencia sobre laminillas de vidrio previamente tratadas con solución de ácido clorhídrico. Posteriormente, las células fueron deshidratadas y fijadas con metanol:acetona. Una vez fijadas, la actividad de peroxidasa endógena de las células se bloqueó con H₂O₂ al 30% disuelto en metanol. Luego se incubaron con los sueros preinmunes o inmunes (sin diluir) o con el suero anti-gp70 (diluido 1:250) o PBS durante toda la noche a 4 °C en cámara de vidrio con humedad. Pasado este tiempo, las células se enjuagaron e incubaron con un suero inespecífico de cerdo durante 30 minutos. Más tarde, las células se incubaron con los anticuerpos secundarios anti-conejo o anti-cabra marcados con HPR. Después de haber sido incubadas, estas se revelaron con DAB.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

4.1 Generación del pAdCMV-envX

El fragmento de la proteína *env* de 1956 pb se amplificó mediante PCR desde el pXMRV (Figura 11). El fragmento *env* se ligó en el vector pCR2.1-TOPO y posteriormente se caracterizó por digestión con la enzima *EcoRI* (Figura 12).

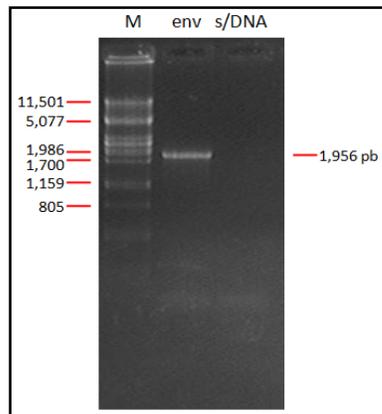


Figura 11. Amplificación por PCR para *env*. M: lambda más *PstI*; *env*: fragmento *env* de 1956 pb; s/DNA: sin DNA. Gel de agarosa al 0.7 % p/v.

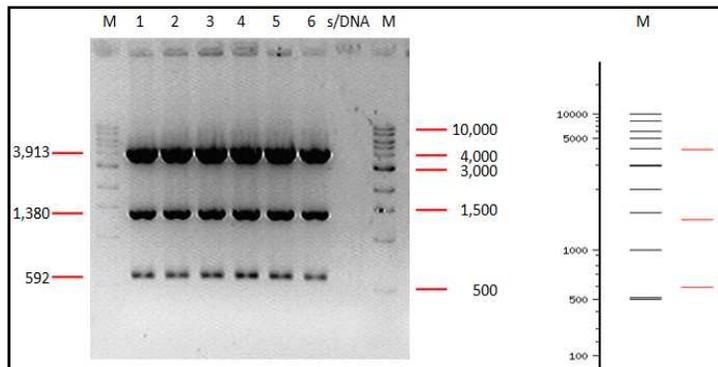


Figura 12. Caracterización de pCR2.1-TOPO-*env* con la enzima *EcoRI*. Se obtuvieron tres fragmentos que coincidieron con el patrón de banda esperado (panel derecho). M: DNA ladder 1.0 Kb; s/DNA: sin DNA; 1-6: clonas caracterizadas.

Posteriormente, el fragmento *env* fue secuenciado. Los oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la secuenciación son descritos en la Tabla 3.

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para llevar a cabo la secuenciación de *env*.

env1182F (5'-3')	env1401R (5'-3')
CCACCCAGAAGACGAGCGAC	TAGTAAGTCCTCCCAACAGC
env561F (5'-3')	M13 F (5'-3')
TTGATTCCTCAGTGGGCTCC	GTAAAACGACGGCCAGTG
env511R (5'-3')	M13 R (5'-3')
TGACCCTTAGGAGTGTTC	CAGGAAACAGCTATGACC

La secuencia nucleotídica obtenida (Figura 13) para el fragmento *env* coincidió con la del fragmento *env* para uno de los aislados del XMRV reportados (Xenotropic MuLV-related virus VP62. No. acceso: EF185282.).

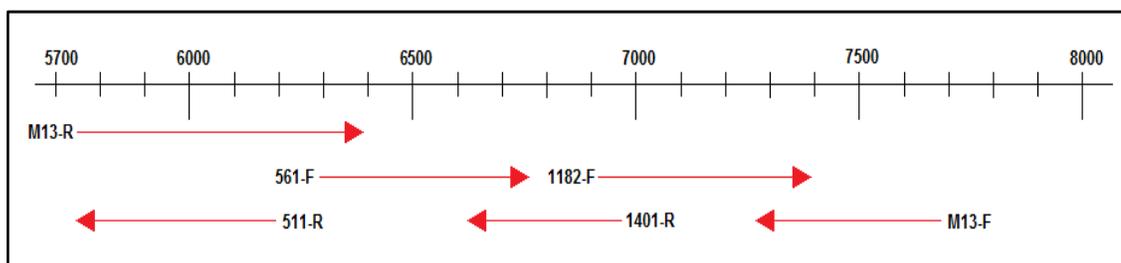


Figura 13. Esquema de la secuenciación realizada. Muestra los fragmentos amplificados utilizando los oligos descritos en la Tabla 3. El fragmento *env* fue secuenciado en su totalidad.

Una vez que *env* fue caracterizado, se aisló cortando en los sitios *KpnI* y *HindIII* y se ligó en el vector pShuttle-CMV. El acarreador con el fragmento *env* (pShuttleCMV-*envX*) fue clonado en bacterias DH5- α competentes. El plásmido fue extraído, purificado y caracterizado mediante digestión con las enzimas *EcoRI*, *KpnI* y *HindIII* (Figura 14).

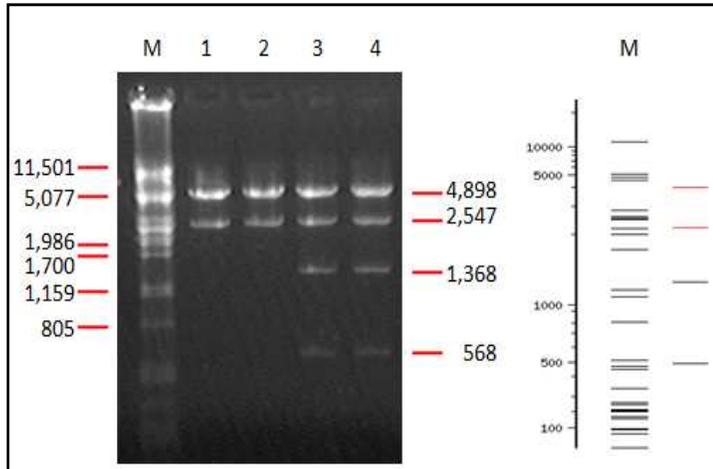


Figura 14. Análisis de restricción para pShuttleCMV-envX con las enzimas *EcoRI*, *KpnI* y *HindIII*. El patrón de bandas obtenido coincide con el esperado (panel derecho). M: lambda más *PstI*; 1-4: clonas analizadas.

El plásmido acarreador fue linearizado con la enzima *PmeI* e introducido en bacterias competentes BJ5183 pretransformadas con el plásmido pAdEasy-1 para generar la recombinación homóloga. El genoma adenoviral recombinante generado (pAdCMV-envX) fue caracterizado con la enzima *HindIII* y PCR (Figuras 15 y 16).

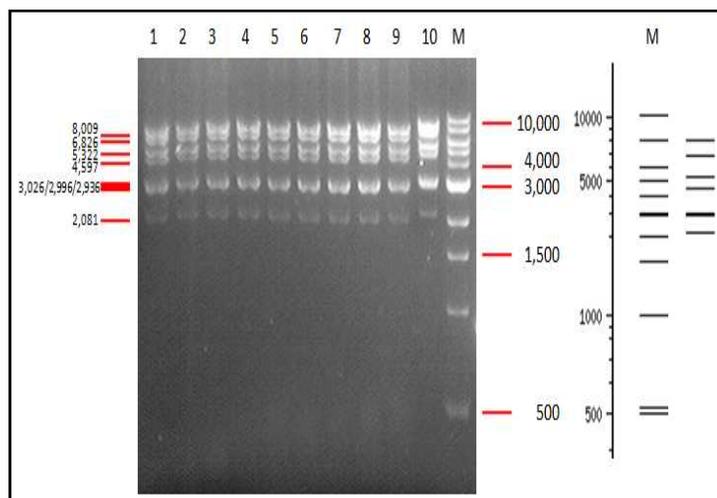


Figura 15. Análisis de restricción para pAdCMV-envX con la enzima *HindIII*. El patrón de bandas obtenidos coincide con el esperado (panel derecho). M: DNA ladder 1.0 Kb; 1-10: clonas analizadas.

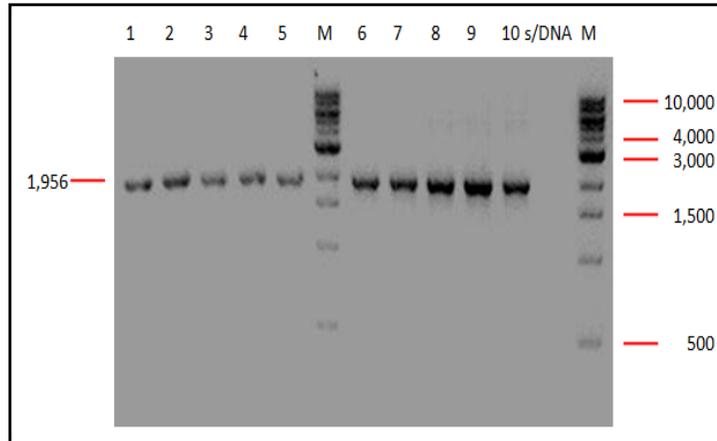


Figura 16. Caracterización por PCR de pAdCMV-envX. Todas las clonas resultaron positivas. M: DNA ladder 1.0 Kb; s/DNA: sin DNA; 1-10: clonas analizadas.

Para corroborar la funcionalidad del cassette de expresión del pAdCMV-envX para la proteína *env*, células HEK293 se transfectaron con 8 µg del plásmido. 72 horas después se hizo una extracción de RNA y se sintetizó el cDNA a partir de este mediante RT-PCR. Entonces el gen *env* del XMRV fue amplificado por PCR a partir de los cDNAs (Figura 17).

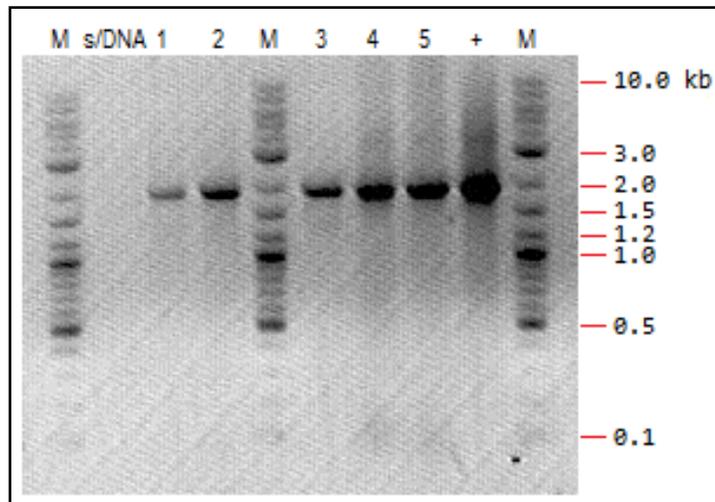


Figura 17. PCR para *env* a partir de cDNA. Se extrajo RNA de la línea celular HEK293 transfectadas con el pAdCMV-envX y del RNA de la línea celular 22Rv1 que expresa copias del XMRV. 1 y 2: cDNA HEK293 transfectadas; 3-5: cDNA 22Rv1 (control positivo); +: pAdCMV-envX (control positivo); s/DNA: sin DNA (control negativo); M: DNA ladder 0.1-10.0 kb.

La línea celular HeLa fue transducida con una MOI de 37 del vector adenoviral. Luego de 24 horas el RNA total fue extraído y se sintetizó el cDNA a partir de este mediante RT-PCR. El gen *env* del XMRV fue amplificado mediante PCR a partir de los cDNAs (Figura 18).

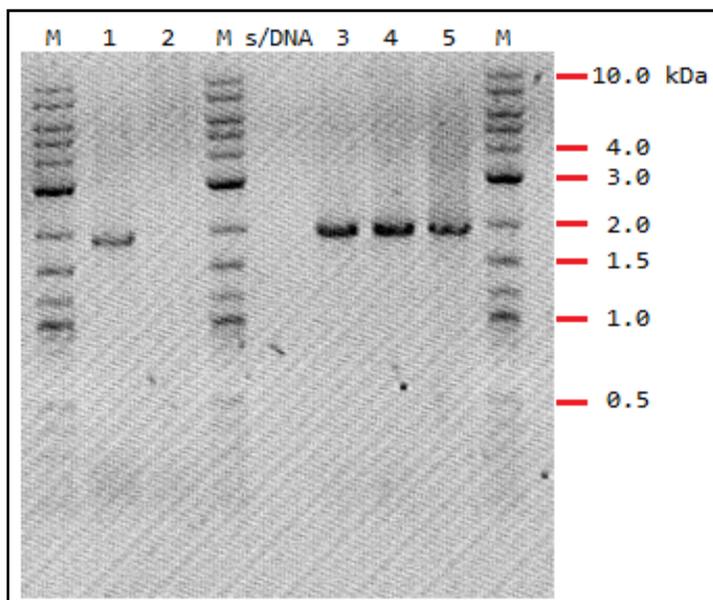


Figura 18. PCR para *env* a partir del cDNA de células transducidas con el AdCMV-*envX*. 1: cDNA de células HeLa transducidas con AdCMV-*envX*; 2: cDNA de células PC3 transducidas con el Ad5-WT; 3: cDNA de células HEK293 transfectadas con el pAdCMV-*envX*; 4: cDNA de la línea celular 22RVI (control positivo); 5: pAdCMV-*envX* (control positivo); s/DNA: sin DNA; M: DNA ladder 0.1-10 kb.

4.2. Producción, purificación y titulación del vector AdCMV-*envX*

Una vez obtenido y caracterizado el pAdCMV-*envX* se transfectaron células HEK293 con Lipofectamina™ 2000. Aproximadamente siete días después cuando el control sin transfectar mostraba daño por tiempo de cultivo y las células transfectadas efecto citopático (Figura 19), estas fueron cosechadas y

lisadas mediante rondas de congelamiento y descongelamiento y utilizadas para la reinfección de nuevas células HEK293, repitiendo este paso una segunda vez. Cuando el efecto citopático fue observado se realizó una PCR para comprobar la presencia del gen *env* en el DNA extraído del vector adenoviral, utilizando dos pares de oligos para amplificar el gen completo y un fragmento de 879 pb del mismo con las condiciones de termociclamiento ya descritas (Figura 20).

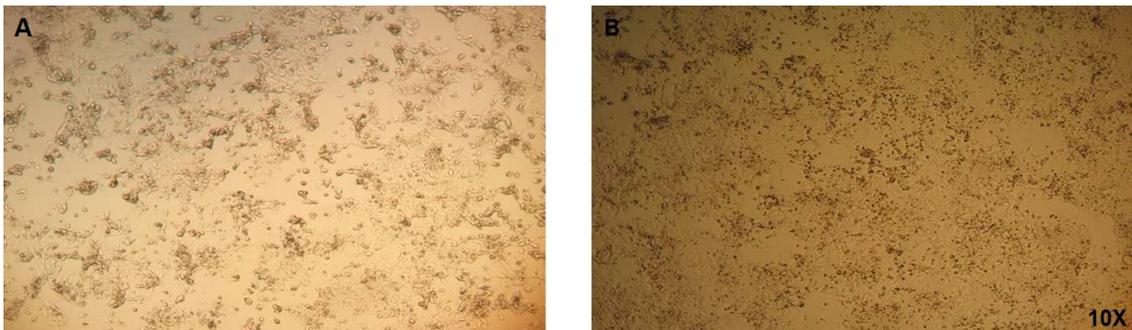


Figura 19. Células HEK293 transfectadas con pAdCMV-envX y sin transfectar. Las células transfectadas muestran efecto citopático por la generación de partículas del vector (Panel A) mientras que las células sin transfectar muestran daño por confluencia (Panel B).

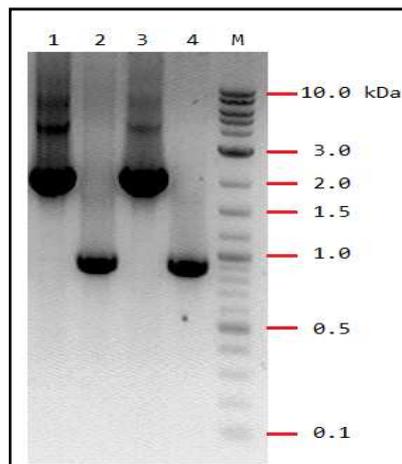


Figura 20. PCR a partir del DNA del vector adenoviral. Carril 1: DNA viral-gen completo; carril 2: DNA viral-fragmento de 879 pb; carril 3: pAdCMV-envX-gen completo; carril 4: pAdCMV-envX-fragmento de 879 pb; M: DNA ladder 0.1-10 kb.

Una vez que se confirmó la identidad del adenovirus, se hizo una producción a gran escala en cincuenta botellas de cultivo T150 y se realizó la purificación del vector mediante ultracentrifugación por gradiente de CsCl y diálisis. El dializado viral se alicuotó y almacenó a -70°C . Posteriormente se realizó la cuantificación de PFU/mL en placas de 96 pozos de los vectores adenovirales y se obtuvo 1×10^{10} PFU/mL.

4.3. Evaluación de los sueros obtenidos de conejos

Los lisados de las células 22Rv1 y PC-3 transducidas con el Ad5-WT se incubaron con los sueros preinmunes o inmunes o con el anti-gp70 y posteriormente con un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con PA o HPR o con un anti-cabra marcado con HPR. Los sueros preinmunes e inmunes de los conejos generaron reacción contra los lisados de las células 22Rv1 y PC-3 transducidas. Sin embargo, la reacción con los sueros inmunes fue más intensa que la de los sueros preinmunes. Cabe mencionar que los patrones de bandas observados utilizando los sueros preinmunes e inmunes de los tres conejos resultaron muy similares (Figuras 21-24). No obstante, utilizando el suero inmune del conejo 2 se produjo una banda muy similar en forma y tamaño a la observada para el control positivo en el extracto de proteínas de las células 22Rv1 (Figura 22). Este resultado positivo contrasta con lo observado con los sueros inmunes de los conejos 1 y 3, en donde no fue posible observar un resultado similar.

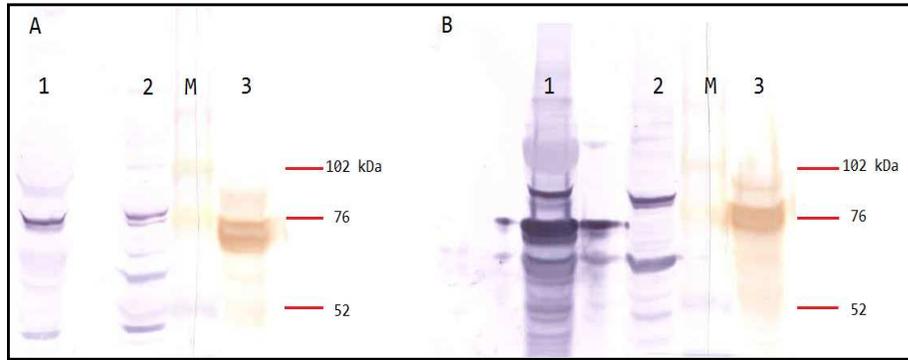


Figura 21. Western blot para los sueros del conejo 1. Panel A: suero preinmune. Panel B: suero inmune. Carril 1: lisado de células PC3 infectadas con Ad5-WT; carril 2: lisado de células 22Rv1; carril 3: lisado de células 22Rv1 incubado con el anticuerpo anti-gp70 de cabra (control positivo); M: marcador de peso molecular.

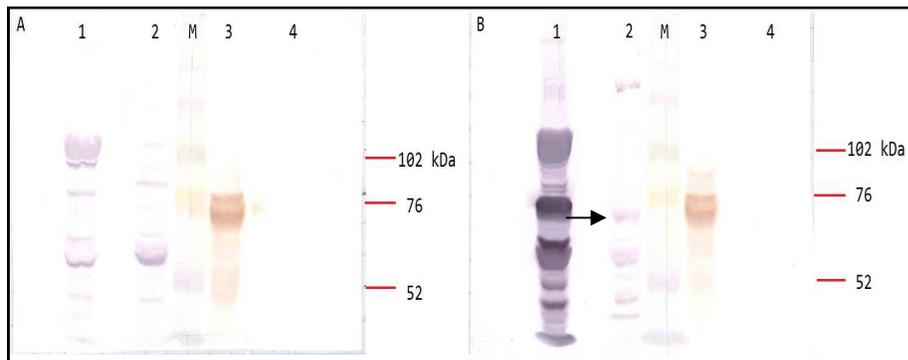


Figura 22. Western blot para los sueros del conejo 2. Panel A: suero preinmune. Panel B: suero inmune; carril 1: lisado de células PC3 infectadas con Ad5-WT; carril 2: lisado de células 22Rv1; carril 3: lisado de células 22Rv1 incubado con anti-gp70; carril 4: lisado de células PC3 infectadas con Ad5-WT incubado con anti-gp70; M: marcador de peso molecular.

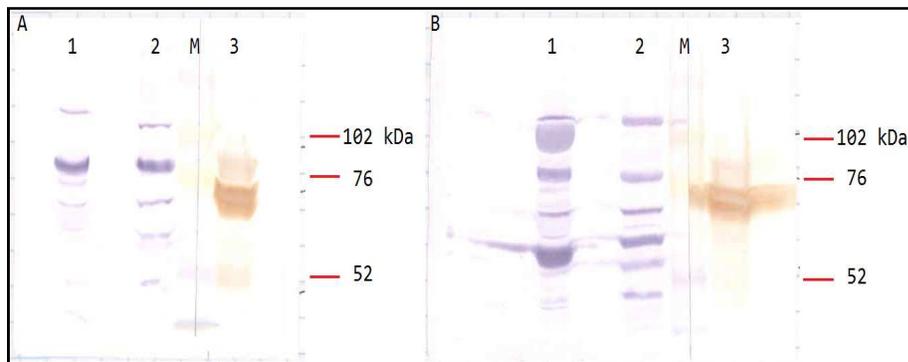


Figura 23. Western blot para los sueros del conejo 3. Panel A: suero preinmune. Panel B: suero inmune; carril 1: lisado de células PC3 infectadas con Ad5-WT; carril 2: lisado de células 22Rv1; carril 3: lisado de células 22Rv1 incubado con anti-gp70; M: marcador de peso molecular.

El anticuerpo secundario marcado con PA reveló un patrón de bandas muy marcado para el control negativo (PC-3 infectadas con el Ad5-WT) en los sueros inmunes y en los preinmunes de todos los conejos y aún más para los sueros inmunes de los conejos 1 y 2. De esta manera se evaluó la utilización de un anticuerpo secundario marcado con HPR para el suero del conejo 2 (Figura 24). Se observó que el anticuerpo secundario marcado con HPR no generó reacción contra los lisados de proteínas de las células (Figura 24, panel A). Por otro lado, aunque el patrón de bandas es muy similar a lo ya observado, estas disminuyeron. Se observó, al igual que cuando se utilizó un anticuerpo secundario marcado con PA, una banda en el lisado de las células 22Rv1 cuyo tamaño y forma fueron muy similares a la observada para el control positivo (Figura 24, panel B).

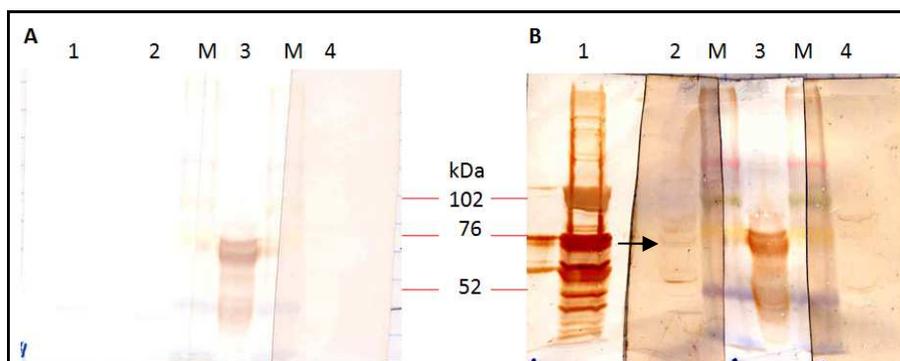


Figura 24. Western blot para el suero inmune del conejo 2 con un nuevo anticuerpo secundario. Panel A: control de los anticuerpos secundarios. Carril 1: lisado de células PC3 transducidas con el Ad5-WT sin incubar con el suero inmune; carril 2: lisado de células 22Rv1 sin incubar con el suero inmune; carril 3: lisado de células 22Rv1 incubado con anti-gp70; carril 4: lisado de células 22Rv1 sin incubar con anti-gp70. Panel B: suero inmune del conejo 2. Carril 1: lisado de células PC3 transducidas con el Ad5-WT incubado con el suero inmune; carril 2: lisado de células 22Rv1 incubado con el suero inmune; carril 3: lisado de células 22Rv1 incubado con anti-gp70; carril 4: lisado de células 22Rv1 sin incubar con anti-gp70.

El suero de los tres conejos fue utilizado en ensayos de inmunocitoquímica. Tanto los sueros preinmunes como inmunes produjeron una reacción contra las proteínas de la células 22Rv1 (Figura 25). Sin embargo, la reacción producida con los sueros preinmunes fue más débil en comparación con los inmunes, los cuales produjeron una reacción específica contra las proteínas de las células. Por su parte, el suero anti-gp70 produjo una reacción mucho más intensa y específica con las proteínas celulares, la cual no se observó en las células incubadas con PBS.

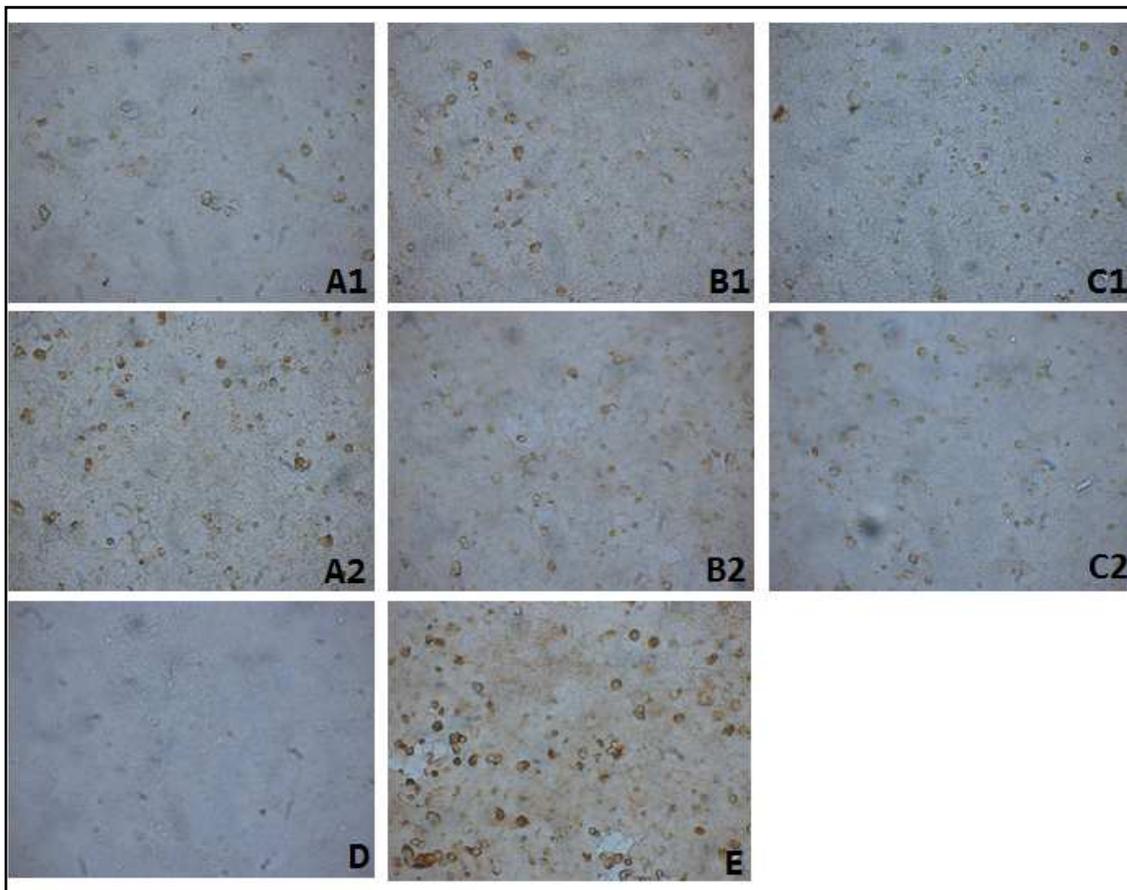


Figura 25. Ensayo de inmunocitoquímica con los sueros de los tres conejos. A1: suero preinmune del conejo 1; A2: suero inmune del conejo 1; B1: suero preinmune del conejo 2; B2: suero inmune del conejo 2; C1: suero preinmune del conejo 3; C2: suero inmune del conejo 3; D: control negativo (sin suero); E: control positivo (incubada con anti-gp70).

CAPÍTULO V

DISCUSIÓN

La utilización de vectores adenovirales ha tenido un impacto grande en la terapia génica para el reemplazo de genes defectuosos. En los últimos años estos también han sido usados para liberación de moléculas antigénicas con el objetivo de producir una respuesta inmune específica por parte del organismo huésped. Basado en el conocimiento que de estos se tienen, se ha logrado superar en gran medida los obstáculos inherentes que estos presentan (*i.e.*, la eliminación del virus por el huésped, la respuesta a antígenos neutralizantes, etc.). La utilización de vectores adenovirales ha quedado demostrada con el vector AdHu5rab, que genera una respuesta inmune específica de anticuerpos neutralizantes contra la glicoproteína del virus de la rabia mucho mayor que la lograda con la clásica vacuna basada en la glicoproteína de este patógeno [55].

En el presente trabajo, se reporta la utilización del vector adenoviral AdCMV-envX como herramienta de liberación de una molécula antigénica, la glicoproteína de envoltura del retrovirus XMRV, con la finalidad de producir un suero policlonal. El suero policlonal producido habrá de servir como una herramienta de diagnóstico para la detección de proteínas del retrovirus X en tejido de cáncer de próstata. Este retrovirus se le ha relacionado al padecimiento de cáncer de próstata hereditario. Sin embargo, actualmente la propia existencia del virus está en duda.

El vector en cuestión fue producido a gran escala y caracterizado. Para la producción de un suero policlonal contra la proteína *env* de este retrovirus fue necesario la inmunización de conejos con el vector adenoviral con dosis relativamente moderadas de partículas virales (1×10^9 , 3.5×10^9 y 1×10^{10} PFU/mL). Posteriormente los conejos fueron sangrados y el suero separado, el cual sirvió para evaluar no solo la presencia de anticuerpos producidos contra el antígeno, sino también la especificidad del mismo mediante ensayos de Western blot e inmunocitoquímica.

Aunque ha sido reportada la vectorización de moléculas antigénicas, esta es la primera vez que se describe la utilización de un vector adenoviral para la liberación de la glicoproteína *env* del XMRV. Esta glicoproteína, que difiere en un alto porcentaje de la de otros retrovirus (solo un 66% de similitud) y por ser una proteína glicosilada que la convierte en altamente inmunogénica, la hace una candidata idónea para la generación de un suero policlonal. La glicoproteína *env* cuya expresión está determinada por el corte y empalme alternativo de los mRNAs, es glicosilada por enzimas intracelulares en el lumen del retículo endoplásmico rugoso que ancla oligosacáridos ricos en manosa, los cuales le proveen la hidrofobicidad para su correcto plegamiento y la estabilidad en su transporte hacia la membrana citoplasmática y en su función [56].

Cabe mencionar, que la inmunización de conejos con el vector adenoviral, se debió en gran medida a la lejanía filogenética que hay entre estos y los ratones. Si bien es cierto que estos últimos han sido utilizados en la generación de

anticuerpos policlonales, los ratones son huéspedes de una gran cantidad de retrovirus endógenos e infecciosos, en particular del MoMLV, cuya cercanía con el XMRV previene la utilización de este roedor como modelo experimental para la producción de un suero policlonal contra el antígeno de interés.

Los conejos fueron inmunizados con una dosis inicial y después con una de refuerzo, induciendo una respuesta inmune específica para el transgén (Figura 22, panel B). Cabe mencionar que, aunque la dosis del vector utilizada para la inmunización de refuerzo fue casi tres veces menor (3.5×10^9 PFU/mL) que la inicial en los conejos 2 y 3, se produjo una respuesta positiva con el suero del conejo 2. Este resultado obtenido con el suero del conejo 2 fue más evidente cuando se reveló con un anticuerpo secundario marcado con HPR (Figura 24, panel B). Este mostró una banda cuya forma y tamaño es similar a la observada para el control positivo. Este resultado indica que se está generando una respuesta inmune contra el antígeno *env*. La utilización de este anticuerpo secundario disminuyó además, la presencia de bandas inespecíficas observadas en el lisado de células PC-3 infectadas con Ad5-WT y de 22Rv1.

Es importante remarcar que los tiempos de inmunización para los tres conejos fueron diferentes, habiendo dos semanas de diferencia entre el conejo 2 y los conejos 1 y 3 en la inmunización de refuerzo (Figura 10). Si bien no existe un cronograma y dosis de inmunización bajo este enfoque, resulta obvio que la dosis menor utilizada en el conejo 1 (1×10^9 PFU/mL) fue insuficiente para la generación de una respuesta inmune para el transgén (Figura 21). Por otro

lado, aunque la dosis de inmunización entre los conejos 2 y 3 fueron similares, las respuestas obtenidas mostraron diferencias entre una y otra, siendo positiva para el suero del conejo 2 y no para el del conejo 3. Esto puede reflejar variación individual, sin descartar también algún error experimental.

El comportamiento de los sueros inmunizados para los tres conejos fue similar. Estos reconocieron proteínas en el extracto de células 22Rv1 y PC-3 infectadas con el Ad5-WT, lo que en última instancia resulta lógico al saber que los conejos fueron inmunizados con vectores adenovirales. Por su parte, la utilización de los sueros preinmunes produjo un patrón de bandas similares en los extractos celulares, aunque menos intensos que los observados para los sueros inmunizados. No existe una explicación clara al respecto, pero esto genera dudas en cuanto a si el animal pudo o no estar expuesto a algún agente adenoviral propio de los conejos.

Los sueros fueron utilizados para ensayos de inmunocitoquímica. Los sueros inmunes generaron reacción específica contra las proteínas de las células 22Rv1 fijadas (Figura 25). Por su parte, el suero anti-gp70 generó una reacción mucho más intensa y específica en las células, la cual no se observó en el control negativo (células 22Rv1 incubadas con PBS). Sin embargo, los sueros preinmunes generaron reacción inesperada contra algunas proteínas celulares, aunque la reacción con estos fue más débil. La explicación para este fenómeno no es clara. Sin embargo, es posible que los animales hayan estado expuestos a algún tipo de retrovirus. Ciertamente, los retrovirus son patógenos comunes

en una gran cantidad de animales y muy frecuentemente en mamíferos [1], lo que no descarta esta posibilidad.

La respuesta generada contra el antígeno *env* del XMRV mediante la inmunización con el vector no fue lo suficientemente potente y específica para generar un suero policlonal capaz de ser utilizado como herramienta de detección. Si bien es cierto que para este caso la inmunización con vectores adenovirales no resultó ser el mejor sistema para la creación de un suero policlonal contra el antígeno *env* del XMRV, varios son los estudios donde se ha reportado con éxito la inducción de una respuesta bajo este enfoque. Esto motivó la construcción de un vector capaz de expresar el antígeno *env* del XMRV. Por ejemplo, la inmunización de ratones con el vector Adrab-gp que expresa la glicoproteína del virus de la rabia logró inducir una potente respuesta mediada por anticuerpos en los primeros siete días y una completa protección de los roedores cuando estos fueron expuestos al virus [55]. Sin embargo, no todos los estudios basados en la utilización de vectores adenovirales como herramientas para la liberación de antígenos han sido exitosos.

La naturaleza del antígeno en cuestión, por si sola no resultó ser el determinante para la inducción de una potente respuesta inmune humoral. Es de suponer que bajo la administración del vector adenoviral se haya producido una respuesta en contra que fuera capaz de eliminar al mismo y disminuir la respuesta específica sobre el transgén [49, 57] tal y como fue observado en los ensayos de Western blot.

Al lado de las dificultades inherentes y de las dificultades técnicas, no es posible determinar una dosis del vector que permita con seguridad obtener una potente respuesta y tampoco resulta posible escalar hacia una dosis mayor debido a los riesgos de citotoxicidad por el mismo. Por otra parte, la variabilidad en las respuestas entre los conejos 2 y 3 hace suponer que no todos los animales responden igual a una misma dosis del vector. Teniendo en cuenta todo lo anterior, resulta necesario replantear el procedimiento utilizado para la generación de un suero policlonal a partir de la inmunización de animales con vectores adenovirales.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES

Se generó y produjo el vector adenoviral que expresa *env* del XMRV.

El suero del conejo 2 produjo una respuesta positiva contra *env* del XMRV.

En los estudios de Western blot, los sueros inmunes y preinmunes de los conejos generaron reacción para los lisados de las células 22Rv1 y PC-3 infectadas con el Ad5-WT.

En los estudios de inmunocitoquímica, los sueros inmunes y preinmunes de los conejos generaron reacción contra las proteínas de las células 22Rv1 fijadas en laminillas.

La débil respuesta y la poca especificidad contra el antígeno exhibida por el suero inmunizado del conejo 2 sugieren que este no es el mejor método para la producción de un suero policlonal.

CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

1. Voisset C, Weiss RA, Griffiths DJ: **Human RNA "rumor" viruses: the search for novel human retroviruses in chronic disease.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2008, **72**(1):157-196, table of contents.
2. Urisman A, Molinaro RJ, Fischer N, Plummer SJ, Casey G, Klein EA, Malathi K, Magi-Galluzzi C, Tubbs RR, Ganem D *et al*: **Identification of a novel Gammaretrovirus in prostate tumors of patients homozygous for R462Q RNASEL variant.** *PLoS Pathog* 2006, **2**(3):e25.
3. Lombardi VC, Ruscetti FW, Das Gupta J, Pfof MA, Hagen KS, Peterson DL, Ruscetti SK, Bagni RK, Petrow-Sadowski C, Gold B *et al*: **Detection of an infectious retrovirus, XMRV, in blood cells of patients with chronic fatigue syndrome.** *Science* 2009, **326**(5952):585-589.
4. Groom HC, Boucherit VC, Makinson K, Randal E, Baptista S, Hagan S, Gow JW, Mattes FM, Breuer J, Kerr JR *et al*: **Absence of xenotropic murine leukaemia virus-related virus in UK patients with chronic fatigue syndrome.** *Retrovirology* 2010, **7**:10.
5. Erlwein O, Kaye S, McClure MO, Weber J, Wills G, Collier D, Wessely S, Cleare A: **Failure to detect the novel retrovirus XMRV in chronic fatigue syndrome.** *PLoS One* 2010, **5**(1):e8519.
6. Cornelissen M, Zorgdrager F, Blom P, Jurriaans S, Repping S, van Leeuwen E, Bakker M, Berkhout B, van der Kuyl AC: **Lack of detection**

- of XMRV in seminal plasma from HIV-1 infected men in The Netherlands.** *PLoS One* 2010, **5**(8):e12040.
7. Hohn O, Strohschein K, Brandt AU, Seeher S, Klein S, Kurth R, Paul F, Meisel C, Scheibenbogen C, Bannert N: **No evidence for XMRV in German CFS and MS patients with fatigue despite the ability of the virus to infect human blood cells in vitro.** *PLoS One* 2010, **5**(12):e15632.
 8. Martinez-Fierro ML, Leach RJ, Gomez-Guerra LS, Garza-Guajardo R, Johnson-Pais T, Beuten J, Morales-Rodriguez IB, Hernandez-Ordonez MA, Calderon-Cardenas G, Ortiz-Lopez R *et al*: **Identification of viral infections in the prostate and evaluation of their association with cancer.** *BMC Cancer* 2010, **10**:326.
 9. Hong P, Li J, Li Y: **Failure to detect Xenotropic murine leukaemia virus-related virus in Chinese patients with chronic fatigue syndrome.** *Virology* 2010, **7**:224.
 10. Sato E, Furuta RA, Miyazawa T: **An endogenous murine leukemia viral genome contaminant in a commercial RT-PCR kit is amplified using standard primers for XMRV.** *Retrovirology* 2010, **7**:110.
 11. Oakes B, Tai AK, Cingoz O, Henefield MH, Levine S, Coffin JM, Huber BT: **Contamination of human DNA samples with mouse DNA can lead to false detection of XMRV-like sequences.** *Retrovirology* 2010, **7**:109.

12. Smith RA: **Contamination of clinical specimens with MLV-encoding nucleic acids: implications for XMRV and other candidate human retroviruses.** *Retrovirology* 2010, **7**:112.
13. Robinson MJ, Erlwein OW, Kaye S, Weber J, Cingoz O, Patel A, Walker MM, Kim WJ, Uiprasertkul M, Coffin JM *et al*: **Mouse DNA contamination in human tissue tested for XMRV.** *Retrovirology* 2010, **7**:108.
14. Hue S, Gray ER, Gall A, Katzourakis A, Tan CP, Houldcroft CJ, McLaren S, Pillay D, Futreal A, Garson JA *et al*: **Disease-associated XMRV sequences are consistent with laboratory contamination.** *Retrovirology* 2010, **7**(1):111.
15. Knouf EC, Metzger MJ, Mitchell PS, Arroyo JD, Chevillet JR, Tewari M, Miller AD: **Multiple integrated copies and high-level production of the human retrovirus XMRV (xenotropic murine leukemia virus-related virus) from 22Rv1 prostate carcinoma cells.** *J Virol* 2009, **83**(14):7353-7356.
16. Silverman RH: **A scientific journey through the 2-5A/RNase L system.** *Cytokine Growth Factor Rev* 2007, **18**(5-6):381-388.
17. Carpten J, Nupponen N, Isaacs S, Sood R, Robbins C, Xu J, Faruque M, Moses T, Ewing C, Gillanders E *et al*: **Germline mutations in the ribonuclease L gene in families showing linkage with HPC1.** *Nat Genet* 2002, **30**(2):181-184.
18. Xiang Y, Wang Z, Murakami J, Plummer S, Klein EA, Carpten JD, Trent JM, Isaacs WB, Casey G, Silverman RH: **Effects of RNase L mutations**

- associated with prostate cancer on apoptosis induced by 2',5'-oligoadenylates.** *Cancer Res* 2003, **63**(20):6795-6801.
19. Kieffer N, Schmitz M, Scheiden R, Nathan M, Faber JC: **Involvement of the RNase L gene in prostate cancer.** *Bull Soc Sci Med Grand Duche Luxemb* 2006(1):21-28.
20. Kim S, Kim N, Dong B, Boren D, Lee SA, Das Gupta J, Gaughan C, Klein EA, Lee C, Silverman RH *et al*: **Integration site preference of xenotropic murine leukemia virus-related virus, a new human retrovirus associated with prostate cancer.** *J Virol* 2008, **82**(20):9964-9977.
21. Schlaberg R, Choe DJ, Brown KR, Thaker HM, Singh IR: **XMRV is present in malignant prostatic epithelium and is associated with prostate cancer, especially high-grade tumors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009, **106**(38):16351-16356.
22. Hohn O, Krause H, Barbarotto P, Niederstadt L, Beimforde N, Denner J, Miller K, Kurth R, Bannert N: **Lack of evidence for xenotropic murine leukemia virus-related virus(XMRV) in German prostate cancer patients.** *Retrovirology* 2009, **6**:92.
23. Sfanos KS, Sauvageot J, Fedor HL, Dick JD, De Marzo AM, Isaacs WB: **A molecular analysis of prokaryotic and viral DNA sequences in prostate tissue from patients with prostate cancer indicates the presence of multiple and diverse microorganisms.** *Prostate* 2008, **68**(3):306-320.

24. Rusmevichientong A, Chow SA: **Biology and pathophysiology of the new human retrovirus XMRV and its association with human disease.** *Immunol Res* 2010.
25. Rodriguez JJ, Goff SP: **Xenotropic murine leukemia virus-related virus establishes an efficient spreading infection and exhibits enhanced transcriptional activity in prostate carcinoma cells.** *J Virol* 2010, **84**(5):2556-2562.
26. Metzger MJ, Holguin CJ, Mendoza R, Miller AD: **The prostate cancer-associated human retrovirus XMRV lacks direct transforming activity but can induce low rates of transformation in cultured cells.** *J Virol* 2010, **84**(4):1874-1880.
27. Lorusso L, Mikhaylova SV, Capelli E, Ferrari D, Ngonga GK, Ricevuti G: **Immunological aspects of chronic fatigue syndrome.** *Autoimmun Rev* 2009, **8**(4):287-291.
28. Lo SC, Pripuzova N, Li B, Komaroff AL, Hung GC, Wang R, Alter HJ: **Detection of MLV-related virus gene sequences in blood of patients with chronic fatigue syndrome and healthy blood donors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**(36):15874-15879.
29. van Kuppeveld FJ, de Jong AS, Lanke KH, Verhaegh GW, Melchers WJ, Swanink CM, Bleijenberg G, Netea MG, Galama JM, van der Meer JW: **Prevalence of xenotropic murine leukaemia virus-related virus in patients with chronic fatigue syndrome in the Netherlands: retrospective analysis of samples from an established cohort.** *BMJ* 2010, **340**:c1018.

30. Erlwein O, Kaye S, Robinson M, McClure M: **Chronic fatigue syndrome: Xenotropic murine leukemia virus-related virus, murine leukemia virus, both, or neither?** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010.
31. Silverman RH, Nguyen C, Weight CJ, Klein EA: **The human retrovirus XMRV in prostate cancer and chronic fatigue syndrome.** *Nat Rev Urol* 2010, **7**(7):392-402.
32. Baraniuk JN: **Xenotropic murine leukemia virus-related virus in chronic fatigue syndrome and prostate cancer.** *Curr Allergy Asthma Rep* 2010, **10**(3):210-214.
33. Yan Y, Liu Q, Kozak CA: **Six host range variants of the xenotropic/polytropic gammaretroviruses define determinants for entry in the XPR1 cell surface receptor.** *Retrovirology* 2009, **6**:87.
34. Dong B, Kim S, Hong S, Das Gupta J, Malathi K, Klein EA, Ganem D, Derisi JL, Chow SA, Silverman RH: **An infectious retrovirus susceptible to an IFN antiviral pathway from human prostate tumors.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007, **104**(5):1655-1660.
35. Yan Y, Liu Q, Wollenberg K, Martin C, Buckler-White A, Kozak CA: **Evolution of functional and sequence variants of the mammalian XPR1 receptor for mouse xenotropic gammaretroviruses and the human-derived XMRV.** *J Virol* 2010.
36. Bhosle S, Suppiah S, Molinaro R, Liang Y, Arnold R, Diehl W, Makarova N, Blackwell J, Petros J, Liotta D *et al*: **Evaluation of cellular determinants required for in vitro xenotropic murine leukemia virus-**

- related virus entry into human prostate cancer and noncancerous cells.** *J Virol* 2010, **84**(13):6288-6296.
37. Dong B, Silverman RH: **Androgen stimulates transcription and replication of xenotropic murine leukemia virus-related virus.** *J Virol* 2010, **84**(3):1648-1651.
38. Stieler K, Schulz C, Lavanya M, Aepfelbacher M, Stocking C, Fischer N: **Host range and cellular tropism of the human exogenous gammaretrovirus XMRV.** *Virology* 2010, **399**(1):23-30.
39. Stieler K, Fischer N: **Apobec 3G efficiently reduces infectivity of the human exogenous gammaretrovirus XMRV.** *PLoS One* 2010, **5**(7):e11738.
40. Hong S, Klein EA, Das Gupta J, Hanke K, Weight CJ, Nguyen C, Gaughan C, Kim KA, Bannert N, Kirchhoff F *et al.*: **Fibrils of prostatic acid phosphatase fragments boost infections with XMRV (xenotropic murine leukemia virus-related virus), a human retrovirus associated with prostate cancer.** *J Virol* 2009, **83**(14):6995-7003.
41. Fischer N, Schulz C, Stieler K, Hohn O, Lange C, Drosten C, Aepfelbacher M: **Xenotropic murine leukemia virus-related gammaretrovirus in respiratory tract.** *Emerg Infect Dis* 2010, **16**(6):1000-1002.
42. Singh IR, Gorzynski JE, Drobysheva D, Bassit L, Schinazi RF: **Raltegravir is a potent inhibitor of XMRV, a virus implicated in prostate cancer and chronic fatigue syndrome.** *PLoS One* 2010, **5**(4):e9948.

43. Garson JA, Kellam P, Towers GJ: **Analysis of XMRV integration sites from human prostate cancer tissues suggests PCR contamination rather than genuine human infection.** *Retrovirology* 2011, **8**:13.
44. Denner J: **Detection of a gammaretrovirus, XMRV, in the human population: open questions and implications for xenotransplantation.** *Retrovirology* 2010, **7**:16.
45. Cooper HM, Paterson Y: **Production of polyclonal antisera.** *Curr Protoc Neurosci* 2009, **Chapter 5**:Unit 5 5.
46. Nelson PN, Reynolds GM, Waldron EE, Ward E, Giannopoulos K, Murray PG: **Monoclonal antibodies.** *Mol Pathol* 2000, **53**(3):111-117.
47. Luo J, Deng ZL, Luo X, Tang N, Song WX, Chen J, Sharff KA, Luu HH, Haydon RC, Kinzler KW *et al*: **A protocol for rapid generation of recombinant adenoviruses using the AdEasy system.** *Nat Protoc* 2007, **2**(5):1236-1247.
48. He TC: **Adenoviral vectors.** *Curr Protoc Hum Genet* 2004, **Chapter 12**:Unit 12 14.
49. Tatsis N, Ertl HC: **Adenoviruses as vaccine vectors.** *Mol Ther* 2004, **10**(4):616-629.
50. Schagen FH, Ossevoort M, Toes RE, Hoeben RC: **Immune responses against adenoviral vectors and their transgene products: a review of strategies for evasion.** *Crit Rev Oncol Hematol* 2004, **50**(1):51-70.
51. Natuk RJ, Davis AR, Chanda PK, Lubeck MD, Chengalvala M, Murthy SC, Wade MS, Dheer SK, Bhat BM, Murthy KK *et al*: **Adenovirus vectored vaccines.** *Dev Biol Stand* 1994, **82**:71-77.

52. Juillard V, Villefroy P, Godfrin D, Pavirani A, Venet A, Guillet JG: **Long-term humoral and cellular immunity induced by a single immunization with replication-defective adenovirus recombinant vector.** *Eur J Immunol* 1995, **25**(12):3467-3473.
53. Barefoot B, Thornburg NJ, Barouch DH, Yu JS, Sample C, Johnston RE, Liao HX, Kepler TB, Haynes BF, Ramsburg E: **Comparison of multiple vaccine vectors in a single heterologous prime-boost trial.** *Vaccine* 2008, **26**(48):6108-6118.
54. Brandsma JL, Shlyankevich M, Zhang L, Slade MD, Goodwin EC, Peh W, Deisseroth AB: **Vaccination of rabbits with an adenovirus vector expressing the papillomavirus E2 protein leads to clearance of papillomas and infection.** *J Virol* 2004, **78**(1):116-123.
55. Xiang ZQ, Yang Y, Wilson JM, Ertl HC: **A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier.** *Virology* 1996, **219**(1):220-227.
56. Loving R, Kronqvist M, Sjoberg M, Garoff H: **Cooperative cleavage of the R peptide in the Env trimer of Moloney murine leukemia virus facilitates its maturation for fusion competence.** *J Virol* 2011, **85**(7):3262-3269.
57. Lasaro MO, Ertl HC: **New insights on adenovirus as vaccine vectors.** *Mol Ther* 2009, **17**(8):1333-1339.