

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE INOCULACIÓN DE ADN DESNUDO EN UN MODELO ANIMAL

ALBERTO GÓMEZ TREVIÑO*, MA. ELENA CANTÚ CÁRDENAS*, EDUARDO I. DE LA ROSA MORENO*, MARGARITA ORTIZ MARTÍNEZ, ARTURO S. VÁZQUEZ Y ELENA MERCADÉ GIL.**

* *Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Nuevo León; México.*

** *Facultat de Farmàcia, Universitat de Barcelona, España.*

Correspondencia: Dr. Alberto Gómez Treviño. Facultad de Ciencias Químicas, UANL. Av. Pedro de Alba s/n. Cd. Universitaria. Sn. Nicolás de los Garza, NL. 66451. México. Tel/Fax: +52 (81) 83529025. E-mail: jegomez@fcq.uanl.mx

Abstract. Antibody generation was possible by inoculation of DNA plasmids encoding the fusogenic F protein of the paramyxovirus SV5 in rabbit. The presence of antibodies was tested on culture cells expressing the F protein transduced with recombinant adenoviruses.

Key words: Antibody, DNA transduction, SV5 F protein.

1. Introducción

Se ha demostrado que la inoculación de animales con ADN desnudo puede inducir una respuesta inmunológica prolongada y activa, de manera que se ha podido conferir inmunidad contra agentes infecciosos tales como virus o bacterias [1-5]. Aunque fueron los trabajos de Wolf y colaboradores [6,7], quienes pusieron de manifiesto la expresión prolongada de proteínas codificadas en ADN inyectado por vía intramuscular o intradérmica, existen trabajos realizados en décadas anteriores que describen aspectos importantes de la inducción de la respuesta inmune a través de estos procedimientos [8]. El objetivo principal de poner en marcha este método de producción de anticuerpos con ADN plasmídico, ha sido con la finalidad de contar con un anticuerpo anti-F destinado a ser utilizado como anticuerpo primario en los ensayos de inmunodetección de la proteína fusogénica F del *paramyxovirus* SV5 [9,10].

2. Materiales y Métodos

Para inducir la producción de anticuerpos mediante inoculación de ADN plasmídico se utilizaron conejos machos de la raza New Zealand. Los animales fueron inoculados con 4 dosis de 100 ug de ADN plasmídico cada una por vía intradérmica en la región lumbar media. El calendario de administración se estableció a los 0, 21, 42 y 63 días. Las dosis fueron administradas en forma de ADN plasmídico purificado (Concert, GibcoBRL) empleando los plásmidos pACCMV.pLPa-F portador del cADN de la proteína fusogénica F de SV5, y pACCMV.pLPa sin cADN insertado a manera de control. Se emplearon los mismos plásmidos preparados anteriormente en la obtención de los adenovirus recombinantes correspondientes y se designó un animal para cada uno de ellos.

Los sueros sanguíneos se obtuvieron de muestras de sangre recolectadas por punción en la oreja a los 0, 31, 52 y 73 días; y posteriormente se emplearon para la detección de anticuerpos anti-F sobre cultivos de células CV-1 y fibroblastos de pulmón de embrión humano transducidas con el adenovirus AdF. Las líneas celulares se hicieron crecer sobre cubreobjetos y una vez llegadas a la confluencia sobre estos fueron infectadas con 75 m.o.i. de AdF o AdlacZ. Transcurridas 48 horas las células se fijaron con PFA 3% durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se aplicaron 3 lavados con PBS de 10 minutos cada uno.

La detección de anticuerpos se llevó a cabo empleando los sueros sanguíneos como anticuerpo primario en diluciones 1:200 y 1:2000 con PB/BSA 3%. Estas preparaciones se dejaron en contacto con las células durante 1 hora a 37 °C con agitación constante. A continuación las monocapas fueron lavadas 3 veces con PBS y enfrentadas a una dilución 1:200 de un anticuerpo secundario (IgG Goat anti-rabbit, Amersham) conjugado con *Texas Red*. Finalmente, las monocapas se lavaron tres veces con PBS y se colocaron sobre portaobjetos con medio orgánico de montaje permanente para ser analizadas por microscopía de fluorescencia a las longitudes de onda de absorción y emisión indicadas para *Texas Red*.



3. Resultados y Discusión

El cADN codificante para la proteína F está incluido en el plásmido pACCMV.pLpA-F preparado y utilizado para la obtención del adenovirus recombinante, y como control se utilizó el plásmido pACCMV.pLpA que no contiene ningún cADN insertado. Cada plásmido se inoculó en un animal y se obtuvieron sueros de muestras de sangre extraídas por punción en la oreja a intervalos de tiempo intercalados con el calendario de inoculación. En la figura 1 se muestra uno de los animales utilizados en este ensayo donde pueden apreciarse los puntos de inoculación en forma de botón durante la administración intradérmica de ADN plasmídico.



Figura 1. Conejos de la raza New Zealand utilizados en la producción de anticuerpos contra la glicoproteína fusogénica F del paramyxovirus SV5 mediante inmunización con ADN desnudo. Manipulación en cepo de los ejemplares de experimentación. Inoculación intradérmica de ADN, se muestra la zona de inoculación con los puntos en forma de botón.

En la figura 2 se muestran imágenes de los resultados obtenidos con las células CV-1. Como puede apreciarse, tanto en las células control como en las infectadas con AdlacZ se obtiene señal de fluorescencia (Figura 2, A-D), aunque resulta evidente que este marcaje es de menor intensidad si se compara con el obtenido en las células infectadas con AdF (Figura 2, E y F), donde puede observarse que el contorno celular se distingue de forma más definida y con una fluorescencia más acentuada.

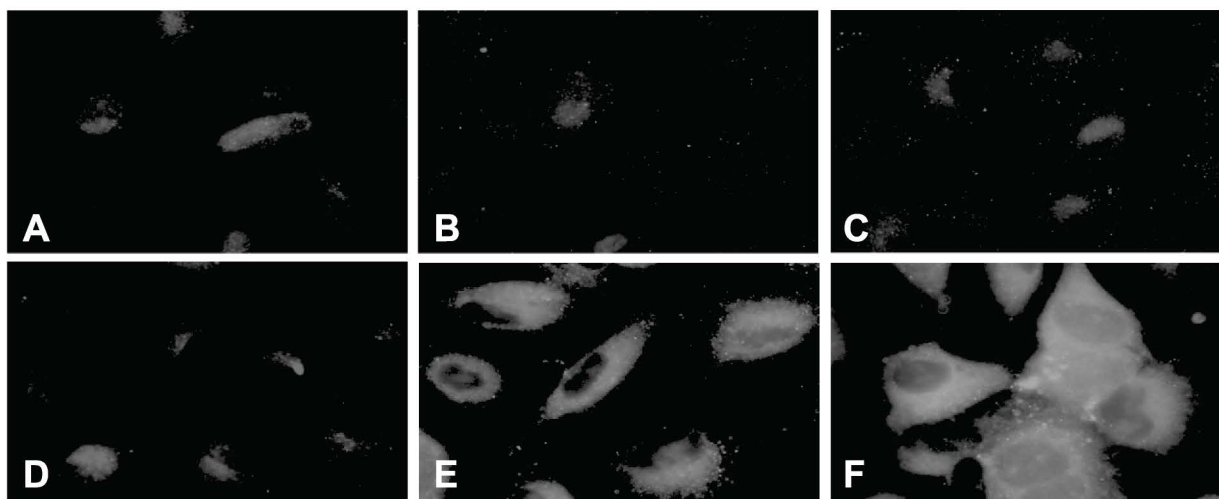


Figura 2. Imágenes de microscopía de fluorescencia de células CV-1 utilizadas en la detección de anticuerpos contra la glicoproteína fusogénica F de SV5 mediante inoculación de DNA desnudo. A y B) Células control. C y D) Células transducidas con AdlacZ (75 m.o.i) 48 horas postinfección. E y F) Células transducidas con AdF (75 m.o.i) 48 horas postinfección. La inmunodetección se realizó con el suero sanguíneo en dilución 1:200. Las imágenes se captaron con microscopio DMRB FLUO/Metamorph.

La figura 3 muestra imágenes de los resultados obtenidos con los fibroblastos de pulmón de embrión humano. Al igual que las células CV-1, tanto los fibroblastos no infectados como los infectados con AdlacZ muestran señal de fluorescencia (Figura 3, A-D), aunque este marcaje es más débil y de menor intensidad si se le compara con el obtenido en las células infectadas con AdF (Figura 3, E y F), en las cuales se puede observar una señal de fluorescencia de mayor magnitud y distinguirse el contorno celular de manera más clara y definida.

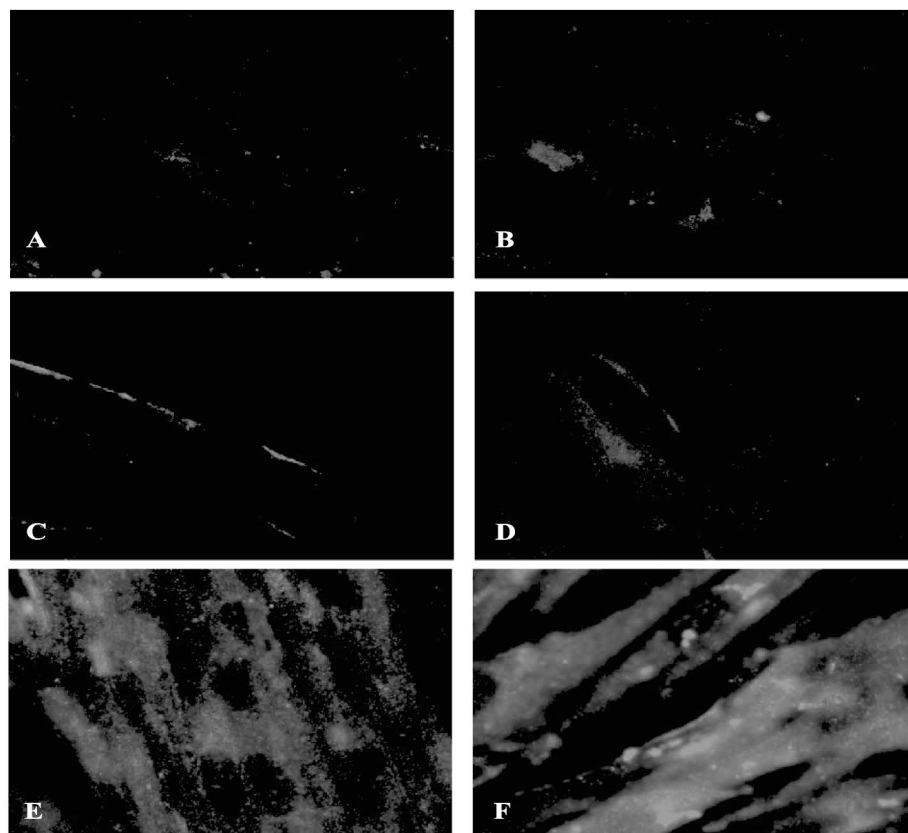


Figura 3. Imágenes de microscopía de fluorescencia de fibroblastos de pulmón de embrión humano utilizados en la detección de anticuerpos contra la glicoproteína fusogénica F de SV5 mediante inoculación de DNA. A y B) Células control. C y D) Células transducidas con 75 m.o.i de AdlacZ 48 horas postinfección. E y F) Células transducidas con 75 m.o.i de AdF 48 horas postinfección. La inmunodetección se realizó con el suero sanguíneo en dilución 1:200. Las imágenes se captaron con microscopio DMRB FLUO/Metamorph.

Si bien en los últimos años se ha demostrado que mediante inmunización con ADN es posible generar respuesta efectiva contra varios agentes infecciosos en los que se incluyen virus, bacterias y protozoarios; no se han establecido aún de manera precisa los mecanismos para su funcionamiento [1]. Todo parece indicar que se induce conjuntamente inmunidad humoral y celular, y que la magnitud de la respuesta inmune generada puede verse afectada tanto por la vía y los medios de administración, como por el tipo de células que expresan el antígeno y su localización [3-5].

Otro factor importante y del cual depende en gran medida la magnitud de la respuesta inmune generada, es la estabilidad del vector utilizado, especialmente si se trata de plásmidos, los cuales deberán contar con un tipo de promotor adecuado, y además, una señal de poliadenilación que confiera estabilidad a los mRNA [1,2]. El plásmido utilizado en nuestros ensayos contaba con estos elementos, pero carecía de un intrón que también está descrito como elemento que incrementa la expresión del transgen. Todo esto implica que las respuestas inducidas tengan que ser evaluadas con cada nuevo antígeno que se ponga a prueba y se hagan modificaciones, por mínimas que estas puedan considerarse, de cualquiera de las condiciones de experimentación establecidas.

4. Conclusión

De acuerdo con los resultados anteriormente expuestos se concluye que existe generación de anticuerpos contra la glicoproteína F del *paramyxovirus* SV5.

5. Referencias

- [1] van Drunen Little-van den Hurk, S., Braun, R. P., Karvonen, B. C., King, T., Yoo, D. and Babiuk, L. A. (1999) Immune responses and protection by DNA vaccines encoding bovine Parainfluenza virus type 3 glycoproteins. *Virology*. 260:35-46.
- [2] Cardoso, A. I., Blixenkrone-Moller, M., Fayolle, J., Buckland, R. and Wild, T. F. (1996) Immunization with plasmid DNA encoding for the measles virus hemagglutinin and nucleoprotein leads to humoral and cell-mediated immunity. *Virology*. 225:293-299.
- [3] Bot, A., Antohi, S., Bot, S., García-Sastre, A. and Bona, C. (1997) Induction of humoral and cellular immunity against influenza virus by immunization of newborn mice with a plasmid bearing a hemagglutinin gene. *International Immunology*. 9(11):1641-1650.
- [4] Ulmer, J. B., Donnelly, J. J., Parker, S. E., Rhodes, G. H., Felger, P. L., Dwarki, V. J., Gromkowski, S. H., Randall Deck, R., DeWitt, C. M., Friedman, A., Hawe, L. A., Leander, K. R., Martínez, D., Perry, H. C., Shiver, J. W., Montgomery, D. L. and Liu, M. A. (1993) Heterologus protection against Influenza by injection of DNA encoding a viral protein. *Science*. 259:1745-1749.
- [5] Manickan, E., Karem, K. L. and Rouse, B. T. (1997) DNA vaccines. A modern gimmick or a boon to vaccinology? *Critical Reviews in Immunology*. 17:139-154.
- [6] Wolff, J. A., Malone, R. W. P., Chong, W., Acsadi, G., Jani, A. and Felner, P. L. (1990) Direct gene transfer into mouse muscle *in vivo*. *Science*. 247:1465.
- [7] Wolff, J. A. (1994). Gene therapeutics. Methods and applications of direct gene transfer. Jon A. Wolff Ed. Birkhäuser. pp. 417.
- [8] Atanasiu, P. (1962) Production de tumeurs chez le hamster par inoculation d'acid de-oxy-nucléique extrait de cultures de tissus infectées par le virus de polyome. *Acad. Sci.*, 254:4228.
- [9] Wu, S. C. and Huang, G. Y. (2002) Production of retrovirus and adenovirus vector for gene therapy: A comparative study using microarraier and sationary cell culture. *Biotechnol. Prog.* 18 (3):617-622.
- [10] Gómez-Treviño A, Castel S, López-Iglesias C, Cortadellas N, Comas-Riu J, Mercadé M. (2003). Effects of adenovirus-mediated SV5 fusogenic glycoprotein expression on tumour cells. *The Journal of Gene Medicine*. 5(6):483-492.

