



INSTITUTO POLITECNICO



NACIONAL

PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

INDUCCIÓN DE TOLERANCIA INMUNOLÓGICA ESPECÍFICA PARA UN  
ANTÍGENO POR MEDIO DE UNA VACUNA DE DNA

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTOR EN CIENCIAS EN**

**BIOMEDICINA MOLECULAR**

PRESENTA

ARTURO REYES SANDOVAL

MEXICO, D.F.

2004

---

ESTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL INSTITUTO WISTAR DE LA CIUDAD DE FILADELFIA, PENNSYLVANIA BAJO LA DIRECCIÓN DE LA DRA. HILDEGUND C. J. ERTL Y LA CODIRECCIÓN DE LA DRA. ETHEL GARCÍA LATORRE DEL DEPARTAMENTO DE INMUNOLOGÍA DE LA ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS, IPN.

---

## ÍNDICE GENERAL

<b>ÍNDICE GENERAL</b> .....	<b>V</b>
<b>ABREVIATURAS</b> .....	<b>VII</b>
<b>RESUMEN</b> .....	<b>VIII</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>IX</b>
<b>INTRODUCCION</b> .....	<b>1</b>
<u>LA TERAPIA GÉNICA Y SUS RETOS</u> .....	1
<u>PAPEL DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA TERAPIA GÉNICA</u> .....	2
<u>RESPUESTA INMUNE HACIA EL VECTOR</u> .....	3
<u>RESPUESTA INMUNE HACIA LA PROTEÍNA TRANSGÉNICA</u> .....	4
<u>EXPERIMENTOS INICIALES TENDIENTES A SUPRIMIR LA RESPUESTA INMUNE EN TERAPIA GÉNICA</u> .....	5
<u>TOLERANCIA INMUNOLÓGICA Y VACUNAS DE DNA</u> .....	6
<u>SECUENCIAS CPG INMUNOESTIMULATORIAS EN LAS VACUNAS DE DNA</u> .....	7
<u>EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS QUE AFECTAN EL BALANCE ENTRE INMUNIDAD Y TOLERANCIA PERIFÉRICA</u> .....	8
<b>JUSTIFICACION</b> .....	<b>10</b>
<b>HIPÓTESIS</b> .....	<b>10</b>
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>11</b>
<u>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</u> .....	11
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>13</b>
<u>EQUIPO</u> .....	13
<u>MATERIAL</u> .....	13
<u>MÉTODOS</u> .....	20
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>35</b>
<u>COMPROBACIÓN DEL GRADO DE METILACIÓN DE LAS SECUENCIAS CPG MEDIANTE TRANSFECCIÓN DE BACTERIAS CON EL GEN DE LA METILASA</u> .....	35
<u>EFFECTO DE LA METILACIÓN DE SECUENCIAS CPG SOBRE LA EXPRESIÓN GENÉTICA</u> .....	37
<u>EFFECTO DE LA METILACIÓN DE SECUENCIAS CPG SOBRE LA RESPUESTA INMUNE</u> .....	39
<u>Respuesta inmune humoral</u> .....	39
<u>Isotipo de anticuerpos generados por vectores metilados y no metilados</u> .....	42
<u>Anticuerpos neutralizantes virales</u> .....	43
<u>Respuesta inmune por linfocitos T cooperadores (T<sub>H</sub>)</u> .....	44
<u>Efecto de la metilación del vector plasmídico sobre el tráfico de células presentadoras de antígeno</u> .....	46

---

<u>Reestablecimiento de la respuesta inmune mediante inoculación de un vector viral recombinante que expresa la glicoproteína de la rabia.</u> .....	49
<u>Efecto de la respuesta inmune sobre la expresión a largo plazo de la proteína transgénica.</u> .....	51
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>54</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>62</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>63</b>

## INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

FIGURA 1. Corte mediante la enzima Hpa II para determinar el grado de metilación del vector plasmídico pSG5rab.gp. 36	36
FIGURA 2. Efecto de la metilación del vector pSG5rab.gp sobre la expresión del gen de la glicoproteína de la rabia. 38	38
FIGURA 3. Respuesta inmune humoral hacia la glicoproteína de la rabia al inyectar vectores no metilados y metilados.....	41
FIGURA 4. Efecto de la inoculación inicial con vector metilado sobre los isotipos de anticuerpos generados.....	43
FIGURA 5. Determinación de anticuerpos neutralizantes	44
FIGURA 6. Secreción de citocinas hacia el medio de cultivo por parte de esplenocitos de ratones inoculados con vectores metilados y no metilados.	45
FIGURA 7. Cuantificación de DNA y RNA en ganglios linfáticos mediante PCR y RT-PCR. ....	47
Figura 8. Amplificación por PCR de DNA plasmídico metilado y no metilado en presencia de extractos de ganglios linfáticos.....	48
FIGURA 9. Anticuerpos dirigidos hacia la glicoproteína de la rabia mediante la inyección sucesiva de vectores plasmídicos con diferencias en metilación y vectores virales recombinantes expresando la misma proteína. ....	50
FIGURA 10. Efecto de la respuesta inmune sobre la expresión a largo plazo de la proteína transgénica <i>in vivo</i> .	53
TABLA 1. Primers o cebadores para curvas estándar en PCR cuantitativa	26
TABLA 2. Cebadores o iniciadores para PCR y RT-PCR en tiempo real.	27
TABLA 3. Primers o cebadores para PCR anidada	28

---

## ABREVIATURAS

APC	Células presentadoras de Antígeno
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNAc	DNA complementario
ELISA	Ensayo Inmunoabsorbente Ligado a Enzima
ERA-BPL	Virus de la rabia, cepa Evelyn Rokitniki Abelseth inactivado con propionolactona
GAPD	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
IFN- $\gamma$	Interferón gamma
IL-2	Interleucina 2
IL-4	Interleucina 4
LB amp	Medio de cultivo Luria Bertani con ampicilina
LB amp/kan	Medio de cultivo Luria Bertani con ampicilina y kanamicina
Met pSG5rab.gp	Vector pSG5rab.gp metilado
MHC	Complejo Mayor (principal) de Histocompatibilidad
M-MLV	Virus Moloney de Leucemia Murina
PBS-BSA	Solución reguladora de fosfatos con albúmina de suero bovino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Rab.gp	Glicoproteína del virus de la rabia
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcripción reversa
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa.
Unm pSG5rab.gp	Vector pSG5rab.gp no metilado
VNA	Anticuerpos neutralizantes virales

---

## RESUMEN

La terapia génica posee un gran potencial para el tratamiento de diversas enfermedades hereditarias. Este tipo de tratamiento basado en la introducción en un individuo de material genético nuevo, tiene algunos retos por vencer. Entre ellos se encuentran el evitar la respuesta inmunológica tanto al vector como hacia la nueva proteína transgénica. Se han propuesto diversas metodologías tendientes a evitar la activación de la respuesta inmune posterior a la terapia génica. Algunas de ellas se basan en la utilización de vectores que inducen una baja respuesta inflamatoria, mientras que otras propuestas se dirigen a modificar la respuesta inmune del organismo. Las vacunas de DNA poseen propiedades inmunoregulatorias capaces de aumentar o suprimir una respuesta inmune hacia una proteína transgénica. Se ha mostrado que la eliminación o metilación de secuencias CpG inmunoestimuladoras en los vectores plasmídicos evitan la aparición de anticuerpos hacia la proteína codificada por el vector. Con base en estos estudios previos, se ha utilizado una vacuna de DNA con las secuencias CpG metiladas con la finalidad de inducir tolerancia inmunológica hacia la proteína transgénica codificada por el mismo vector. En nuestra investigación, hemos encontrado que no hay activación de la respuesta inmune en ratones posterior a inyecciones repetidas de dosis baja de un vector metilado que codifica una proteína altamente inmunogénica, como la glicoproteína del virus de la rabia (rab.gp). Inoculación de cantidades elevadas del vector metilado generaron una respuesta humoral de baja magnitud. Por su parte el vector no metilado indujo la producción de anticuerpos contra la rab.gp. Nuestros resultados también mostraron que la previa vacunación con el plásmido metilado, redujo la respuesta inmune humoral y celular contra la proteína transgénica, aunque no la eliminó por completo ya que se recuperó parcialmente cuando se inoculó una vacuna no metilada y totalmente con adenovirus recombinantes expresando la proteína transgénica. Estos tratamientos constituyen un estímulo ligero y fuerte, respectivamente. Los resultados obtenidos no son consecuencia del cambio en el tipo de respuesta cooperadora entre T<sub>H</sub>1 y T<sub>H</sub>2, como demostraron el análisis del isotipo de los anticuerpos generados y el perfil de citocinas secretados por células esplénicas aisladas de ratones inoculados con los vectores. La posterior cuantificación de DNA y RNA en ganglios linfáticos, mostró que al inocular una vacuna de DNA metilada, el vector llega a los ganglios que drenan el músculo en menor proporción que la vacuna no metilada. Por su parte la expresión y por lo tanto la presentación del antígeno rab.gp fue similar con ambas vacunas, debido en gran parte al efecto del interferón gamma (IFN- $\gamma$ ). De manera interesante, solamente hubo expresión de moléculas coestimuladoras como CD 86 en ganglios linfáticos, al inyectar el vector no metilado. En conclusión, la vacunación con un vector plasmídico metilado interfiere con la activación de la respuesta inmune humoral y celular, aunque no la elimina por completo. Los resultados son compatibles con un estado de tolerancia parcial cuyo mecanismo se debe a anergia, la cual es caracterizada por la incapacidad de producir IL-2 por parte de los linfocitos tras un estímulo antigénico *in vitro*. Esto último se produjo como consecuencia de la ausencia de coestimulación o señal 2 durante la presentación de antígeno. Finalmente, el efecto que tiene la administración de un vector metilado sobre el sistema inmune permite la expresión de una proteína transgénica por un periodo de tiempo prolongado, lo cual podría resultar útil en terapia génica cuando ésta se realice con vectores que no provoquen una respuesta inflamatoria considerable.

---

## ABSTRACT

Gene therapy offers great potential for the treatment of many inherited human diseases. Despite great efforts, this modality of treatment is faced by two main challenges; transfer of sufficient copies of the replacement gene into specific target cell populations and long-term expression of therapeutic levels of the transgene product. Effectiveness of gene transfer protocols has been hampered by lack of sustained expression of the transgene products. The immune response to vectors and transgene proteins plays a major role in the elimination of expression on the long term. Besides activating the immune response, DNA vaccines may also interfere with the differentiation, expansion or effector functions of B and T cells due to the immunoregulatory properties. It has been shown that the elimination or methylation of immunostimulatory CpG sequences in plasmid vectors abrogates the antibody response to the transgene in mice. In this study, we pursued the generation of antigen-specific tolerance to a transgene by initial priming with a methylated plasmidic vector. Repeated vaccination with a methylated DNA vaccine did not generate a humoral response and interfered, although not completely with the T and B cell activation by a subsequent boost with an unmethylated DNA vaccine coding for the same transgene. Nevertheless, the immune response was partially present upon administration of high doses of methylated vector and was fully restored by delivery of a recombinant adenovirus expressing the rab.gp protein completely reestablished the B cell response. Low responsiveness was not due to a skew of the  $T_H1/T_H2$  response, as revealed by the isotype profile of the antibodies generated as well as the lymphokines released by splenocytes in medium. Moreover, quantification of plasmidic DNA and RNA expression revealed a decreased uptake of the transgene to draining lymph nodes and a lack of co-stimulatory signals by a methylated DNA vaccine, despite similar levels of transgene expression during antigen presentation in lymph nodes by both vectors. Our results show that a methylated DNA vaccine induces a state of partial tolerance by a mechanism of anergy, which is characterized by diminished production of IL-2 upon antigen stimulation *in vitro*, and is induced by lack of co-stimulation during antigen presentation in lymph nodes. Modulation of the immune response by a methylated vaccine allows for long-term expression of the transgenic protein and could be a useful approach for gene therapy provided that the vector does not have high inflammatory properties.

---

## INTRODUCCION

### ***LA TERAPIA GÉNICA Y SUS RETOS***

La terapia génica consiste en el tratamiento de enfermedades por medio de la introducción en el individuo de material genético nuevo. Esta área de la medicina relativamente joven surgió en un principio como una opción al tratamiento de enfermedades hereditarias para corregir un defecto genético de manera definitiva y no sólo temporal. El tratamiento de enfermedades adquiridas, como las infecciosas y el cáncer, resultó también viable al paso del tiempo.

Entre los logros que este tipo de tratamiento ha tenido desde su creación, están la demostración de la transferencia de material genético a humanos y la obtención de respuestas biológicas de importancia (Crystal 1995). Sin embargo, debido a que se trata de un área del conocimiento surgida hace pocos años, la terapia génica enfrenta un gran número de retos, como la introducción de nuevo material genético únicamente en las células blanco apropiadas y en cantidades suficientes para lograr que la nueva proteína transgénica alcance niveles terapéuticos; regular los niveles de expresión genética para que la proteína no exceda los niveles deseados o se produzca por debajo de ellos; lograr la expresión del gen por tiempos prolongados; y evitar una respuesta inmune hacia la nueva proteína, así como hacia el vector que transporta al gen (Kay, Liu et al. 1997; Nabel 1999).

Gran parte de la problemática de la terapia génica se centra en el vector utilizado para transportar el gen, ya que de éste depende la eficiencia de la transferencia genética

---

---

así como la expresión a largo plazo del gen en cuestión. Los métodos empleados en terapia génica se clasifican en indirectos o *ex vivo*, en el que las células son modificadas genéticamente *in vitro* para trasplantarlas posteriormente; los métodos directos o *in vivo* consisten en la introducción del material genético en el organismo mediante un vector; y los métodos *in situ*, en los que la administración se da directamente en el órgano afectado. Los vectores utilizados pueden ser de dos tipos: virales y no virales. Los métodos directos son más eficientes en cuanto a la transferencia de material genético a las células aunque poseen desventajas que han impedido su utilización de manera general en humanos, como su alta inmunogenicidad, la posible generación de enfermedades, introducción del gen de manera inespecífica y su expresión por tiempos cortos y por debajo de niveles terapéuticos. Como ejemplos están los vectores retrovirales, adenovirus, virus adeno-asociados (AAV) y virus herpes-simplex (Robbins, Tahara et al. 1998). Los vectores no virales como los lípidos catiónicos, polímeros, sistemas basados en péptidos y DNA desnudo, son fáciles de producir y no generan patologías, aunque son menos efectivos en cuanto a la transferencia genética *in vivo* (Schatzlein 2001).

### **PAPEL DE LA RESPUESTA INMUNE EN LA TERAPIA GÉNICA**

Uno de los principales obstáculos que la terapia génica ha enfrentado desde sus inicios ha sido lograr una expresión genética sostenida a largo plazo. Se ha observado que la inmunidad humoral y celular contra el vector y la nueva proteína transgénica, son de gran importancia en la expresión genética *de novo* (Yang, Li et al. 1995; Yang, Jooss et al. 1996).

---

## **RESPUESTA INMUNE HACIA EL VECTOR**

La respuesta inmune contra el vector es de especial importancia cuando se utilizan vectores adenovirales. Los adenovirus recombinantes son un sistema muy atractivo y ampliamente utilizado en terapia génica, ya que poseen las ventajas de poder infectar una gran variedad de células sin necesidad de que estas se dividan. Además el virus puede obtenerse en grandes cantidades (Wilson 1996). Este vector, sin embargo, tiene desventajas como la inestabilidad en la expresión genética, ya que su DNA no se integra a cromosomas, lo que hace necesario su administración repetida. El problema es aún mayor si se considera que el virus induce una respuesta inmune celular de tipo citotóxica, lo suficientemente fuerte para eliminar las células infectadas por el vector y terminar con la expresión del gen introducido. La respuesta inmune humoral agrava aún más la situación, ya que la formación de anticuerpos afecta la sucesiva transferencia genética mediada por adenovirus (Yang, Li et al. 1995; Yang, Jooss et al. 1996). El problema anterior ha tratado de solucionarse mediante la eliminación de los marcos de lectura abierta de las secuencias E4 del virus recombinante para hacerlo menos inmunogénico (Wang and Finer 1996). Sin embargo, la reacción inflamatoria producida por los adenovirus sigue siendo su principal problema, y es muy posible que continúen siendo modificados mediante la eliminación de múltiples secuencias para disminuir sus propiedades inflamatorias, o que se busquen vectores alternativos como los virus adeno-asociados (AAV), especialmente después de la primera muerte registrada de un paciente sometido a tratamiento por terapia génica con adenovirus (Lehrman 1999). Los AAV son vectores atractivos para el tratamiento de ciertas enfermedades como la hemofilia B, ya

---

que permiten la expresión genética a largo plazo con niveles terapéuticos sin evocar una respuesta inmune en animales inmunocompetentes (Herzog, Hagstrom et al. 1997).

### ***RESPUESTA INMUNE HACIA LA PROTEÍNA TRANSGÉNICA***

La respuesta inmune hacia la proteína transgénica es también uno de los problemas de gran importancia para el éxito de la terapia génica. En los primeros intentos realizados para hemofilia A y B en animales, la expresión genética de los factores VIII y IX de la coagulación fue transitoria debido a la formación de anticuerpos inhibitorios contra dichas proteínas (Connelly, Mount et al. 1996; Hortelano, Al-Hendy et al. 1996). A pesar de años de estudio, no es posible conocer con certeza que individuos desarrollarán anticuerpos inhibitorios. Sin embargo, se ha observado que la naturaleza de la mutación, factores genéticos y también el contexto en el que el individuo se exponga al antígeno, son importantes para la generación de la respuesta inmune hacia la proteína transgénica (Kaufman RJ Human Gene Therapy 1999).

El papel que juega la naturaleza de la mutación se hizo evidente en estudios de personas con deficiencia en factor IX de la coagulación. La secuenciación del gen del factor IX en la población completa de los enfermos de hemofilia B en Suecia, mostró que a pesar de que la probabilidad de formar anticuerpos inhibitorios en los enfermos es de 3%, se alcanza un 20% cuando la persona posee un gen con una extensa secuencia perdida, como en el caso de mutaciones con codones de paro tempranos, o deleciones genéticas (Green, Montandon et al. 1991; Green, Montandon et al. 1991). Esto también apoya la observación de que la formación de anticuerpos inhibitorios es mayor en enfermos con hemofilia A que en aquellos con hemofilia B, ya que las deleciones de gran

---

tamaño son infrecuentes en hemofilia B, mientras que el 40% de los casos graves de hemofilia A tienen inversiones genéticas (Lakich, Kazazian et al. 1993). Otros factores genéticos aún no comprendidos del todo también son importantes en la generación de anticuerpos inhibitorios ya que estos se producen de manera diferente en individuos del mismo grupo familiar y con la misma mutación (Hoyer 1995).

El contexto en el que el enfermo se expone al antígeno es también un factor determinante para la formación de anticuerpos inhibitorios. Ya se mencionó con anterioridad que algunos vectores como los adenovirus inducen una respuesta inmune extremadamente fuerte que incluye anticuerpos contra la nueva proteína transgénica; mientras que los AAV no provocan una respuesta tan fuerte y por consecuencia es menor el riesgo de desarrollar anticuerpos inhibitorios cuando se utiliza dicho vector (Fisher, Jooss et al. 1997).

### ***EXPERIMENTOS INICIALES TENDIENTES A SUPRIMIR LA RESPUESTA INMUNE EN TERAPIA GÉNICA***

Los esfuerzos iniciales por evitar la respuesta inmune hacia la nueva proteína transgénica o hacia el vector se basaron en la administración de agentes inmunosupresores, como el CTLA4-Ig y la ciclosporina A (Fang, Eisensmith et al. 1995; Kay, Holterman et al. 1995). Sin embargo, la utilización de este tipo de compuestos provoca infecciones y toxicidad lo cual los hace poco atractivos. Se ha demostrado que la inoculación intratímica también induce falta de respuesta hacia antígenos exógenos, aunque el tamaño del timo en humanos adultos no permite que esta técnica sea práctica (DeMatteo, Raper et al. 1995).

---

La inmunosupresión local también se ha inducido mediante la generación de vectores que expresan el gen de interés junto con alguna otra molécula inmunosupresora, como la glicoproteína de 19kDa de la región E3 del adenovirus (Lee, Abina et al. 1995), el antagonista del receptor de interleucina-1 (McCoy, Davidson et al. 1995) o la interleucina 10 viral (Qin, Ding et al. 1997). Todos estos métodos han tenido sólo resultados parciales ya que aunque se suprime la respuesta local no se logra una inmunosupresión sistémica.

### **TOLERANCIA INMUNOLÓGICA Y VACUNAS DE DNA**

La activación clonal de linfocitos T requiere de la presentación de un antígeno por parte de las células presentadoras de antígeno APC (del *inglés* “*antigen presenting cell*”), en las proteínas del complejo mayor de histocompatibilidad clase I ó II (MHC I o MHC II) al receptor de células T (TCR de “T-cell receptor”). Los linfocitos B funcionan también como células presentadoras de antígeno, al cual capturan a través de su receptor BCR (de “B-cell receptor”) y lo presentan igualmente a linfocitos T en las moléculas clase I y II. La presentación del antígeno a un linfocito en una interacción que involucra al MHC y al TCR es también conocida como señal 1. Los linfocitos pueden aceptar la señal 1 proveniente de una APC, pero son activados solamente si reconocen al mismo tiempo una molécula coestimuladora, por ejemplo CD86 (B7-2) en la superficie de la APC (Kim, Bagarazzi et al. 1997). A esta última se le conoce como señal 2 (Matzinger 1994). El modelo anterior, conocido como de las “dos señales”, postula que la expresión de moléculas coestimuladoras o señal dos durante la presentación del antígeno determina si el linfocito será activado o colerizado (Lafferty and Cunningham 1975).

---

Janeway y colaboradores (Janeway 1989; Janeway 1992; Janeway, Goodnow et al. 1996) han propuesto que otro de los eventos esenciales en la generación de una respuesta inmune es el reconocimiento de patrones microbianos asociados a patogenicidad (PAMPs, del inglés “*pathogen-associated microbial patterns*”), reconocidos por los llamados receptores de reconocimiento de patógenos (PRRs del inglés “*pathogen-recognition receptors*”) que se expresan de manera constitutiva en la superficie de células del sistema inmune innato, como las células dendríticas (Fearon and Locksley 1996). De acuerdo con el concepto de la señal 0, las células dendríticas inmaduras se activan y expresan moléculas coestimuladoras al reconocer PAMPs como el lipopolisacárido o las secuencias CpG inmunoestimuladoras (Bauer, Redecke et al. 2001).

### **SECUENCIAS CpG INMUNOESTIMULATORIAS EN LAS VACUNAS DE DNA**

Las secuencias inmunoestimuladoras de DNA (ISS del inglés “*immunostimulatory DNA sequences*”), también conocidas como secuencias CpG son motivos en el DNA compuestos por una citosina seguida de una adenina presentes en contextos especiales en el DNA, es decir, la secuencia CpG debe estar precedida por dos purinas en la región 5', seguidas a la vez por dos pirimidinas en la región 3'. Cuando las secuencias CpG se encuentran de esta manera en el DNA activan al sistema inmune innato para producir citocinas inmunoestimuladoras (Krieg, Yi et al. 1995; Pisetsky, Reich et al. 1995). Las secuencias CpG son aproximadamente 20 veces más comunes en el DNA bacteriano que en el de organismos vertebrados; mientras que en estos últimos además de la baja frecuencia el 80% de las citosinas de las secuencias CpG se encuentran metiladas. La capacidad inmunoestimuladora de las secuencias CpG se pierde cuando la citosina es

---

reemplazada por metilcitosinas, como se ha observado cuando las secuencias CpG bacterianas son metiladas (Krieg and Wagner 2000).

Una vacuna de DNA consiste en un vector plasmídico compuesto por dos unidades principales. El “esqueleto del plásmido” que posee propiedades adyuvantes debido a la presencia de secuencias CpG, y la unidad de transcripción constituida por un promotor, un DNAC que codifica para un antígeno y una secuencia de poliadenilación. Todos ellos en conjunto dirigen la síntesis de la proteína con la cual se pretende inmunizar (Tighe, Corr et al. 1998). La importancia de las secuencias CpG como adyuvantes internos en las vacunas de DNA se ha demostrado en experimentos en los que la magnitud de la respuesta inmune generada por la vacuna de DNA depende de la cantidad de secuencias inmunoestimuladoras presentes en el plásmido empleado (Sato, Roman et al. 1996). Se ha comprobado también que la inmunogenicidad de las vacunas de DNA se reduce cuando las secuencias CpG son metiladas, lo cual demuestra que dichas secuencias inmunoestimuladoras desempeñan un papel importante en la inducción de las respuestas inmunológicas antígeno específicas (Klinman, Yamshchikov et al. 1997).

### ***EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS QUE AFECTAN EL BALANCE ENTRE INMUNIDAD Y TOLERANCIA PERIFÉRICA***

El sistema inmunológico de los mamíferos produce un gran número de linfocitos con receptores antigénicos capaces de reconocer una enorme variedad de antígenos microbianos. Este proceso también involucra la generación de linfocitos autoreactivos que reconocen antígenos propios del organismo. Por ello, el sistema inmunológico ha desarrollado mecanismos para eliminar o inactivar este tipo de células autoreactivas.

---

Tales procesos se llevan a cabo durante el desarrollo temprano de los linfocitos en órganos linfoides primarios como el timo y la médula ósea (Kappler, Roehm et al. 1987; Hartley, Cooke et al. 1993); en etapas posteriores de activación y proliferación clonal en órganos linfoides secundarios como ganglios linfáticos, bazo y placas de Peyer; y finalmente en órganos no linfoides (Mondino, Khoruts et al. 1996). Los órganos linfoides secundarios están diseñados para permitir el contacto entre antígeno, APC y linfocitos T y B. Estos órganos son de especial interés en la inducción de una respuesta inmune, así como en la generación de tolerancia inmunológica mediante vacunas de DNA debido a que las células dendríticas que son transfectadas durante la vacunación con DNA, migran a dichos órganos como los ganglios linfáticos que drenan la zona inyectada (Condon, Watkins et al. 1996).

En estos órganos, los linfocitos T y B son susceptibles a ser eliminados durante su activación mediante una señal apoptótica originada por alguna proteína perteneciente a la familia del factor de necrosis tumoral, como el ligando de Fas (Fas L) o el propio TNF- $\alpha$  (Zheng, Fisher et al. 1995).

---

## **JUSTIFICACION**

Las vacunas de DNA poseen secuencias CpG inmunoestimuladoras que funcionan como adyuvantes internos estimulando la respuesta inmune específica para un antígeno (Klinman, Yamshchikov et al. 1997). En nuestro laboratorio se ha demostrado que la metilación de las secuencias CpG de una vacuna de DNA no propicia la formación de anticuerpos hacia una proteína transgénica (Pasquini, Deng et al. 1999). Con base en estas observaciones, nos propusimos investigar si la inyección de una vacuna de DNA con secuencias CpG metiladas no sólo no produce una respuesta inmune humoral, sino también inhibe la respuesta celular y humoral que pudiera generarse tras la posterior vacunación con un vector plasmídico, que bajo condiciones normales genera una fuerte respuesta inmunológica contra la glicoproteína del virus de la rabia. Adicionalmente, se investigarán las causas de la falta de respuesta inmunológica hacia el antígeno cuando se inyecta una vacuna metilada, y por último, se determinará si la disminución de la respuesta inmune mediante el vector metilado permite la expresión a largo plazo de la proteína transgénica.

## **HIPÓTESIS**

Existen tres señales necesarias para inducir una respuesta inmune específica para un antígeno. La señal 0 esta dada por componentes microbianos como el lipopolisacárido o las secuencias inmunoestimuladoras CpG del DNA que activan a las células dendríticas induciendo la expresión de la señal 2, o moléculas coestimuladoras sobre su superficie y

---

que a la vez interaccionan con los linfocitos durante la presentación del antígeno -señal 1- en los órganos linfoides secundarios.

Cuando la presentación de antígeno se realiza en ausencia de alguna de las otras dos señales, el linfocito que la recibe se anergiza o toleriza. Las vacunas de DNA proporcionan la señal 0 a través de las secuencias CpG de DNA, así como la señal 1 o presentación del antígeno codificado por la vacuna.

Por lo tanto, si las secuencias CpG de una vacuna de DNA son metiladas, y el gen codificado por el vector plasmídico es expresado y presentado por células dendríticas en ausencia de la señal 2, es posible que se genere tolerancia inmunológica.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar si se induce un estado de tolerancia inmunológica tras la inyección de un vector plasmídico metilado que expresa el gen que codifica para la glicoproteína de la rabia.

### ***OBJETIVOS ESPECÍFICOS***

1. Determinar si la metilación del vector plasmídico que contiene el promotor SV40 no afecta la expresión de un gen que se encuentre bajo la influencia de dicho promotor.
2. Analizar a diferentes tiempos la respuesta inmune humoral tras inyectar repetidamente un vector metilado que codifica para rab.gp. Determinar la

---

respuesta humoral con diferentes cantidades de vector, así como por inyecciones sucesivas del mismo.

3. Analizar el efecto de la inoculación inicial con un vector metilado sobre la respuesta humoral en ratones que posteriormente serán vacunados con vectores que bajo condiciones normales genera una fuerte respuesta inmune.
4. Analizar la respuesta inmune celular (linfocitos T cooperadores del tipo TH1 y TH2) tras la inyección de un vector no metilado en ratones vacunados inicialmente con una vacuna de DNA metilada.
5. Determinar si la modificación en la respuesta inmune se debe a la disminución en el transporte y expresión del vector plasmídico en los ganglios linfáticos o a la ausencia de moléculas coestimuladoras necesarias para generar una respuesta inmune a la proteína transgénica.
6. Evaluar la expresión genética a diferentes tiempos y determinar si la expresión de la proteína por el vector metilado se realiza por un periodo más prolongado en comparación con el vector no metilado.

---

## MATERIAL Y MÉTODOS

### **EQUIPO**

1. Microcentrífuga para eppendorfs, Brinckmann modelo eppendorf 5415 C.
2. Equipo para corrimiento de geles: fuente de poder Biorad modelo power pac 200 y 3000 X, contenedor para geles Life Technologies modelo Horizon 58, transiluminador, camara fotográfica fotodyne.
3. Centrífuga refrigerada Sorvall modelo RT 6000B.
4. Centrífuga IEC modelo thermo.
5. Ultracentrífuga Sorvall modelo RC 5B con rotores SS-34 y GSA
6. Ultracentrífuga Beckman L-80.
7. Termociclador LightCycler para cuantificación de DNA y RNA en tiempo real.
8. Termociclador Perkin Elmer modelo cetus.

### **MATERIAL**

1. Aislamiento de DNA:
  - a. Equipo para aislamiento de DNA libre de lipopolisacárido. EndoFree plasmid mega kit, QIAGEN (Cat. No. 12381)
  - b. Estándares de DNA para corrimiento de geles.  $\lambda$ -Hind III, Invitrogen Life technologies (Cat. No. 10382-018) y marcador en escalera de 100 pares de bases, Invitrogen Life technologies (Cat. No. 10380-02).
2. Aislamiento de RNA.
  - a. Reactivo TRI, Molecular Research Center Inc (Cat. No. TR 118); solución BCP (1-Bromo-3-Cloropropano) Sigma (Cat. No. B9673); agua tratada con

- 
- dietilpirocarbonato (DEPC) Ambion (Cat. No. 9922); DNasa Ambion (Cat. No. 2222); reactivo para remover DNAsas "DNA-free" Ambion (Cat. No. 1906).
- b. Solución saturada de fenol:cloroformo pH 6.7, Fisher Scientific (Cat. No. ICN802520).
3. Síntesis de DNAc y, PCR y RT-PCR en tiempo real y transcripción *in vitro*.
- a. Transcriptasa inversa de Virus Moloney de Leucemia Murina (M-MLV), Invitrogen Life Technologies (Cat. No. 28025013).
- b. PCR: Mezcla de desoxinucleótidos trifosfato (dNTP) 10 mM Invitrogen Life Technologies (Cat. No. 18427013); ditioteitol (DTT) Invitrogen Life Technologies (Cat. No. 15508013); Taq DNA polimerasa recombinante Invitrogen Life Technologies (Cat. No. 10342012).
- c. PCR y RT-PCR en tiempo real: Equipo de amplificación SYBR green I para RT-PCR en LightCycler Roche Inc (Cat. No. 2 015 237); Equipo para amplificación de DNA SYBR green para PCR en LightCycler Roche Inc (Cat. No. 2 015 099).
- d. Transcripción *in vitro*: Reactivos para transcripción *in vitro* MAXIscript de Ambion (Cat. No. 1308-1326).
4. Oligonucleótidos.
- a. Glicoproteína de la rabia (rab.gp): Sentido 5' – AAA GCA TTT CCG CCC AAC AC – 3'; anti-sentido 5' – GGT TAC TGG AGC AGT AGG TAG A - 3'.
- b. Interferón gamma (IFN- $\gamma$ ): Sentido 5' – CCA CGG CAC AGT CAT TGA AA – 3'; anti-sentido 5' GAC CTC AAA CTT GGC AAT AC – 3'.

- 
- c. CD 86: Sentido 5' GAG CCC ATG TCC TTG ATC TGA AC – 3'; anti-sentido 5' – GAG CCC ATG TCC TTG ATC TGA AC – 3'.
- d. Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPD): Sentido 5' – GGT GAA GGT CGG TGT GAA CGG ATT T – 3'; anti-sentido: AAT GCC AAA GTT GTC ATG GAT GAC C – 3'.
5. Oligonucleótidos utilizados como estándar para la cuantificación de RNA. Al crearse los oligonucleótidos se insertó la secuencia del promotor T7 río arriba del oligonucleótido con la finalidad de realizar transcripción *in vitro* del RNA y utilizar diluciones seriadas como estándar para la RT-PCR cuantitativa.
- a. IFN- $\gamma$ : sentido 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAT GAA CGC TAC ACA CTG CA – 3'; anti-sentido 5' – AAT CTC TTC CCC ACC CCG AAT CAG CAG CGA CTC – 3'.
- b. CD 86: sentido 5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAT GGA CCC CAG ATG CAC CA – 3'; anti-sentido 5' – ACT GCC TTC ACT CTG CAT TTG GTT TTG CTG AAG CAA – 3'.
- c. GAPD: sentido 5' – TAC GAC TCA CTA TAG GAT GGT GAA GGT CGG TGT GA – 3'; antisentido 5' – ACT CCT TGG AGG CCA TGT AGG CCA TGA GGT CCA CCA CC – 3'.
6. Ratones. Se utilizaron ratones de la cepa C3H/He, adquiridos en los laboratorios Charles River de Wilmington, Maryland EU. Los ratones se mantuvieron en el bioterio del Instituto Wistar.
7. Líneas celulares: Se utilizaron las siguientes células: fibroblastos de ratón L929; células de riñón de hamster bebé BHK-21 (del inglés Baby Hamster Kidney); línea celular HT-2 dependiente de interleucina 2 (IL-2) e interleucina 4 (IL-4) para su

---

proliferación. Las células 293 de riñón de embriones humanos (Graham, Smiley et al. 1977).

8. Transfección de células y análisis de la expresión genética. Reactivo de lipofectina. Invitrogen Life technologies (Cat. No. 18292011); medio con suero reducido Optimem I Invitrogen Life technologies (Cat. No. 11058021); anticuerpos policlonales anti-IgG de ratón (0.85 mg/mL) obtenidos en el laboratorio; Anticuerpos de cabra contra inmunoglobulinas de ratón, conjugados con FITC. ICN/CAPPEL (Cat. No. 55499). Solución azul de tripano aL 4% Sigma (Cat. No. T-8154).
9. Medios de cultivo:
  - a. Medio RPMI 1640 completo Cellgro (Cat. No. MT 10-040-CM). A 500 mL de medio se adicionaron 50 mL de suero fetal bovino (FBS) Hyclone (Cat. No. SH30070.03); 5.5 mL de solución de penicilina-streptomina Cellgro (Cat. No. 30-002-CI); 0.5 mL de solución de gentamicina Gibco Invitrogen (Cat. No. 15710-064); 5.5 mL de amortiguador Hepes Cellgro (Cat. No. 25-060-CI).
  - b. 2% MLC: Mixed Lymphocyte Culture Medium. A 4500 mg/litro de DMEM, formulación con alto contenido de glucosa se adicionan los siguientes reactivos: 2% de suero bovino fetal (FBS) inactivado con calor; 10mM MOPS; 0.05 mM 2-mercaptoetanol; 100 U/mL de penicilina; 100 µg/mL de estreptomina; 216 mg/litro de L-glutamina; 116 mg/litro de L-arginina; 36 mg/litro de L-asparagina; 6 mg/litro de ácido fólico; 110 mg/litro de piruvato de sodio; 2 g/litro de NaHCO<sub>3</sub>.
  - c. Medio Leibovitz's L-15, Cellgro (Cat. No. MT 10-045-CV).

- 
- d. Medio Luria Bertani (LB) con ampicilina (LB amp) y/o kanamicina (LB amp/kan) a una concentración de 50 µg/mL. Bio 101 systems, cápsulas (Cat. No. 3002-031).
  - e. Medio SOC para transformación de bacterias *E. coli* cepa DH5α (Life technologies Cat. No. 15544-018).
  - f. Medio de cultivo RPMI 1640 con timidina tritiada (<sup>3</sup>H) a una concentración de 1mCi/50 µL. Perkin Elmer (Cat. No. NET 355).

#### 10. Virus:

- a. Virus de la rabia, cepa Evelyn Rokitniki Abelseth inactivado con propionolactona (ERA-BPL). El virus ERA fue propagado en células de riñón de hamster bebé BHK-21, se purificó mediante ultracentrifugación en gradiente de sacarosa y fue inactivado con β-propionolactona.
- b. Virus de la rabia cepa CVS-11. Esta cepa del virus de la rabia se cultivó en células de riñón de hamster bebé BHK-21.
- c. Adenovirus recombinante conteniendo el gen de la glicoproteína de la rabia (Adrab.gp). La construcción del virus ha sido detallada con anterioridad. El vector Adrab.gp contiene el gen de la proteína g de la cepa Evelyn Rokitniki Aelseth, el cual se encuentra bajo la influencia del promotor de citomegalovirus (CMV). El vector se propagó en células 293, a partir del cual se aisló y purificó mediante ultracentrifugación en gradiente de CsCl (Xiang, Yang et al. 1996).

#### 11. Bacterias:

- 
- a. *Escherichia coli* cepa DH5 $\alpha$ , células competentes para transformación con plásmidos. Life technologies (Cat. No. 18265-017).
  - b. *E. coli* cepa ERI1821. En ella se propagaron de manera conjunta los plásmidos pSG5rab.gp y pAIT-2, cuando se requirió la metilación del primero.

#### 12. Plásmidos:

- a. pSG5rab.gp: Este plásmido tiene un promotor temprano del virus SV40, en el cual se clonó el gen que codifica la glicoproteína de la rabia (rab.gp)
- b. pAIT-2: Plásmido que contiene el gen que codifica la metilasa Sssl de *Espiroplasma sp.* El plásmido fue proporcionado por los laboratorios New England Biolabs.

#### 13. Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima (ELISA):

- a. Se utilizaron placas de 96 pozos con fondo en forma de U, Immuno II Nunc, Dinamarca).
- b. Anticuerpos.
  - i. Anticuerpos monoclonales de rata anti IL-2, Pharmingen (Cat No. 18161 D); IL-4, Pharmingen (Cat. No. 18191 D) e IFN- $\gamma$ , Pharmingen (Cat. No. 18181 D); todos ellos contra citocinas de ratón
  - ii. Anticuerpos monoclonales de rata marcados con biotina, anti IL-2 Pharmingen (Cat. No. 18172D), IL-4 Pharmingen (Cat. No. 18042D) e IFN- $\gamma$  Pharmingen (Cat. No. 18112D); todos contra citocinas de ratón,
  - iii. Anticuerpos de cabra anti biotina marcados con peroxidasa, Calbiochem (Cat. No. 203206).

- 
- iv. Anticuerpos de cabra vs ratón marcados con fosfatasa alcalina.  
ICN/CAPPEL biomedical, Inc. (Cat. No. 59294).
  - c. Citocinas
    - i. Interleucina-2 recombinante de ratón. Sigma (Cat. No. I0523).
    - ii. Interleucina-4 recombinante de ratón. Sigma (Cat. No. I1020).
    - iii. Interferón-g recombinante de ratón. Sigma (Cat. No. I4777).
  - d. Sustratos y proteínas conjugadas:
    - i. Tabletas de fosfatasa, p-N-fenil fosfato, Sigma (Cat. No. 104-105).
    - ii. Conjugado de avidina-peroxidasa de rábano, Sigma (Cat. No. A-3151).
    - iii. TMB (3,3\_,5,5\_-Tetramethylbenzidine). Calbiochem (Cat. No. 613544).
  - e. Amortiguadores:
    - i. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS), pH 7.2.
    - ii. PBS con albúmina de suero de bovino (BSA) al 3% (3% PBS-BSA).
    - iii. PBS-Tween al 0.05%.
  - f. Kit para la determinación de sub-isotipo de anticuerpos en hibridomas,  
Calbiochem (Cat. No. 386445).

---

## MÉTODOS

### 1. Preparación de DNA.

- a. Transformación de bacterias. Bacterias competentes del género y especie *E. coli* cepa DH5 $\alpha$  adquiridas en Life Technologies se mantuvieron en alícuotas de 50  $\mu$ l a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Previo a su utilización, se descongelaron y mantuvieron en hielo a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se adicionó de 1 a 10 ng de DNA plasmídico disuelto en 5  $\mu$ l a un eppendorf que contenía una alícuota de 50  $\mu$ l de bacterias competentes. Se incubaron en hielo por 30 min. Posteriormente se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 20 s y se colocaron en hielo durante 2 min. Se adicionaron 0.95 mL de medio SOC. Las bacterias se incubaron durante 1 h a  $37^{\circ}\text{C}$  en agitación para permitir la expresión del gen de resistencia a ampicilina. Posteriormente se adicionó un volumen de 100  $\mu$ L a placas Petri con medio LB que contenía ampicilina para seleccionar las bacterias transformadas. Las placas Petri se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 18 h.
- b. Metilación de DNA. El plásmido pSG5rab.gp se introdujo en bacterias *E. coli* cepa ERI 1821 que contienen el plásmido pAIT-2 que codifica para la metilasa de *Spiroplasma sp.* Se realizó la misma técnica para la transformación de las bacterias mencionada en el inciso anterior, con la diferencia de que en este caso se utilizó medio de cultivo LB con ampicilina y kanamicina (LB amp/kan).
- c. Aislamiento y purificación de DNA. El procedimiento se basó en la lisis bajo condiciones alcalinas de bacterias que contenían el plásmido de interés, seguido por la adsorción del DNA en resinas de intercambio aniónico,

---

lavado del DNA en la resina, elusión con amortiguador con alto contenido en sales, eliminación del lipopolisacárido o endotoxina, concentración con isopropanol y solubilización en amortiguador con Tris y EDTA libre de endotoxinas. El DNA se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización. El proceso se describe a continuación: Se seleccionó una colonia aislada en medio con agente selectivo. Se inoculó un tubo con 2 mL de medio de cultivo líquido LB con ampicilina y/o kanamicina. Las bacterias se incubaron en agitación a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 8 a 20 h. El cultivo inicial se diluyó 1:500 o 1:1000 en 500 mL de medio selectivo. Se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  durante 12 a 16 h en agitación. Las bacterias se colectaron mediante centrifugación a  $6000 \times g$  durante 15 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . Se adicionaron 50 mL de amortiguador P1 (Tris EDTA en agua, pH 8, con RNasas); 50 mL de amortiguador P2 (NaOH en agua con SDS al 20%); se incubó durante no más de 5 min a temperatura ambiente y se adicionaron 50 mL de amortiguador P3 en frío (acetato de potasio en agua, pH 5.5); La suspensión se introdujo en un cartucho Mega-QIAGEN conectado al vacío. Se incubó durante 10 min a temperatura ambiente y se filtró al vacío. Se adicionaron 50 mL de amortiguador FWB (NaCl, MOPS y tritón x-100 en agua, pH 7). Se adicionaron 12.5 mL de amortiguador ER<sup>®</sup> para eliminar endotoxinas, y se incubó durante 30 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . El lisado se introdujo en columnas con resina de intercambio aniónico previamente equilibradas. Una vez adsorbido, el DNA se lavó con amortiguador QC (NaCl, MOPS e isopropanol, pH 7); se eluyó con amortiguador QN (alta concentración de NaCl, MOPS e isopropanol, pH 7); el DNA se precipitó con la adición de 24.5 mL de isopropanol, se centrifugó a  $15000 \times g$  durante 30

---

min a 4°C. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó con 7 mL de etanol al 70% y centrifugación a 15000 x g durante 10 min; el sobrenadante se descartó y el botón se dejó secar durante 10 min. El DNA se disolvió en amortiguador TE (Tris-EDTA pH 8). La concentración de DNA se determinó por espectrofotometría a 260 nm.

- d. Determinación del grado de metilación del DNA. 1 µg de ambos DNAs, metilado y no metilado, se incubó con 10 IU de la enzima de restricción Hpa II en 50 µl de agua en baño maría a 37°C durante 24 h. 200 ng de DNA se depositaron en pozos de un gel de agarosa al 1% y se separaron aplicando un voltaje de 120 V durante 15 a 20 min. Los fragmentos de DNA fueron fotografiados en el gel mediante el uso de una cámara en un transiluminador con luz ultravioleta.
- e. Transfección de células y verificación de la expresión del gen codificador de rab.gp. Se utilizaron 2 µg de DNA plasmídico aislado mediante la técnica y reactivos QIAGEN libre de endotoxinas. El DNA y el reactivo lipídico, o lipofectamina, fueron adicionados de manera separada a 100 µl de reactivo Opti-mem I libre de suero. Se incubaron a temperatura ambiente durante 15 a 45 min para permitir la formación de complejos lipídicos con el DNA. Posteriormente se adicionaron 800 µl de las soluciones a células L929 con una confluencia del 50 a 70% en placas de medio de cultivo de 6 pozos. Las células se incubaron durante 3 h a 37°C en ambiente de CO<sub>2</sub> al 5%. El medio fue reemplazado por RPMI-1640 completo y se continuó la incubación en las mismas condiciones durante 48 h. Al final del período de

---

incubación, las células fueron tratadas con tripsina, se contaron en cámaras de Neubauer y se adicionaron en duplicado  $5 \times 10^5$  células por pozo en placas para cultivo de 96 pozos en forma de U. Se centrifugaron a  $260 \times g$  durante 5 min; se adicionaron 25  $\mu\text{l}$  de PBS o medio sin suero a cada uno de los pozos del duplicado y 25  $\mu\text{L}$  de anticuerpos contra rab.gp a una concentración de 1.7  $\mu\text{l}/\text{mL}$  en PBS. Se incubaron de 15 a 45 min a  $4^\circ\text{C}$ ; las células se lavaron dos veces con 150  $\mu\text{L}$  de PBS y centrifugaciones a  $260 \times g$  durante 5 min. Se adicionaron a todos los pozos 25  $\mu\text{L}$  de una solución que contenía anticuerpos de cabra contra inmunoglobulinas de ratón, conjugados con FITC; se incubaron de 15 a 30 min a  $4^\circ\text{C}$ ; se lavaron 4 veces con PBS, se centrifugó durante 5 min a  $260 \times g$ ; las células fueron resuspendidas en 400  $\mu\text{L}$  de PBS y analizadas por citometría de flujo.

## 2. Preparación de RNA.

- a. Aislamiento y purificación de RNA. Se utilizó el reactivo TRI que ofrece la ventaja de poder aislar DNA, RNA y proteínas de una misma muestra. El RNA se obtuvo de ganglios linfáticos inguinales que drenan el músculo en el que fue inyectada la vacuna de DNA. Se obtuvieron 2 ganglios por ratón para hacer un total de 10 por grupo. Se analizaron muestras de tres grupos, uno inyectado con DNA metilado, otro con DNA no metilado y un grupo no inoculado. Los ganglios linfáticos se colocaron de manera individual en tubos conteniendo 1 mL de reactivo TRI. Las células se disgregaron con un homogenizador polytron durante 10 s, asegurándose de limpiar el aparato entre cada muestra. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente por

---

5 min para permitir la disociación completa de los complejos de nucleoproteínas. Se adicionó 0.1 mL de solución BCP, las muestras se agitaron durante 15 s en vórtex y se incubaron de 2 a 15 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron a 12000 x g por 15 min y la fase acuosa se transfirió a tubos eppendorf nuevos, libres de RNAsas. La fase orgánica se mantuvo a 4°C para el posterior aislamiento de DNA. Se adicionó a la fase acuosa un volumen de 0.5 mL de isopropanol por cada mililitro de TRI utilizado en la etapa inicial de homogenización. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente de 5 a 10 min y se centrifugaron a 12000 g durante 8 min a 4°C. El precipitado fue purificado con etanol al 75% y las muestras se centrifugaron a 7500 g durante 5 min a 4°C. El etanol se eliminó y las muestras se mantuvieron durante 3 min a temperatura ambiente para permitir la evaporación del alcohol. El RNA se solubilizó en 89 µl agua destilada tratada con dietilpirocarbonato (DEPC). Posteriormente se degradó el posible DNA contaminante mediante la adición de 1 µL de DNasa y 10 µL de solución amortiguadora para DNAsas. Las muestras se incubaron durante 30 min en baño maría a 37°C y la enzima fue inactivada y removida con el reactivo “DNA-free”. Las soluciones con RNA se mantuvieron a -20°C hasta su utilización para RT-PCR.

- b. Transcripción *in vitro*. Esta técnica fue utilizada para la elaboración de una curva estándar que permitiera la cuantificación de diferentes transcritos de RNA en ganglios linfáticos mediante RT-PCR en tiempo real. Los genes de IFN- $\gamma$ , CD86 y GAPD fueron amplificados de ganglios linfáticos de ratón

---

mediante PCR, incluyendo en el cebador 5' la secuencia del promotor del fago T7 para que ésta quedara insertada río arriba de cada gen (ver inciso c). El gen rab.gp fue transcrito directamente en el plásmido pSG5 linearizado que contiene la secuencia del promotor del fago T7. A 1 µg de DNA se adicionaron 1 µL de ATP, GTP, CTP y UTP a una concentración de 10 mM; 2 µl de amortiguador de transcripción; 1 µL de RNA polimerasa del fago T7. Se adicionó agua libre de RNasas hasta alcanzar un volumen de 20 µl. Se incubó a 37°C durante 16 h. El DNA se removió mediante incubación con DNasa a 37°C durante 20 min, la cual se eliminó con la adición del reactivo de inactivación de DNasa del equipo "DNA-free" de Ambion (Catalogo No. 1906). El RNA se cuantificó mediante espectrofotometría a 260 nm y se calculó el número de moléculas de RNA mediante la siguiente fórmula:  $(6 \times 10^{23} \text{ copias/mol} \times \text{concentración de RNA en g/}\mu\text{L}) / \text{peso molecular en g/mol}$ . Las curvas estándar consistieron en diluciones seriadas de RNA en rangos de concentración de  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^2$  moléculas de RNA.

- c. Reacción en cadena de la polimerasa para preparación de estándares para PCR y RT-PCR cuantitativos. Esta técnica se empleó para los genes de IFN- $\gamma$ , CD 86, GAPD y rab.gp. Se aisló RNA de ganglios linfáticos obtenidos de ratones de la cepa C3H/He (la técnica de aislamiento de RNA se describió anteriormente). Se sintetizó DNAc mediante la enzima transcriptasa inversa del virus Moloney de leucemia murina (M-MLV). El DNAc de cada gen se amplificó mediante PCR con cebadores en los que se

incluyó la secuencia del promotor del fago T7 (TAA TAC GAC TCA CTA TAG G). Los cebadores se describen a continuación:

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	
Sentido	5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAT GAA CGC TAC ACA CTG CA – 3'
Anti-sentido	5' – AAT CTC TTC CCC ACC CCG AAT CAG CAG CGA CTC – 3'
<b>CD 86</b>	
Sentido	5' – TAA TAC GAC TCA CTA TAG GAT GGA CCC CAG ATG CAC CA – 3'
Anti-sentido	5' – ACT GCC TTC ACT CTG CAT TTG GTT TTG CTG AAG CAA – 3'
<b>GAPD</b>	
Sentido	5' – TAC GAC TCA CTA TAG GAT GGT GAA GGT CGG TGT GA – 3'
Anti-sentido	5' – ACT CCT TGG AGG CCA TGT AGG CCA TGA GGT CCA CCA CC – 3'

TABLA 1. Cebadores para curvas estándar en PCR cuantitativa

La PCR se realizó bajo las siguientes condiciones: Una desnaturalización inicial a 94°C durante 5 min, seguida de 35 ciclos que incluyeron: desnaturalización a 94°C por 1 min; alineamiento a 55°C por dos min y extensión a 72°C durante 3 min.

- d. PCR y RT-PCR cuantitativo. Se utilizaron los siguientes cebadores para la amplificación y cuantificación de DNA y RNA en tiempo real:

<b>Rab.gp</b>	
Sentido	5' – AAA GCA TTT CCG CCC AAC AC – 3'
Anti-sentido	5' –GGT TAC TGG AGC AGT AGG TAG A – 3'

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	
Sentido	5' – CCA CGG CAC AGT CAT TGA AA – 3'
Anti-sentido	5' – GAC CTC AAA CTT GGC AAT AC – 3'
<b>CD 86</b>	
Sentido	5' –ATG GGC TTG GCA ATC CTT ATC TT – 3'
Anti-sentido	5' – GAG CCC ATG TCC TTG ATC TGA AC – 3'
<b>GAPD</b>	
Sentido	5' – GGT GAA GGT CGG TGT GAA CGG ATT T - 3'
Anti-sentido	5' – AAT GCC AAA GTT GTC ATG GAT GAC C – 3'

TABLA 2. Cebadores o iniciadores para PCR y RT-PCR en tiempo real.

La RT-PCR en tiempo real consistió en un ciclo de transcripción inversa a 55°C durante 10 min, seguida de 40 ciclos que incluyeron una desnaturalización inicial a 95°C durante 5 s; alineamiento a 55°C durante 10 s; extensión a 72°C durante 18 s. Se incluyó un paso adicional para la adquisición de fluorescencia a 2 °C por debajo de la temperatura de separación para las hebras, a fin de eliminar la fluorescencia inespecífica. La temperatura de adquisición fue para GAPD 84 °C; rab.gp 81 °C; IFN- $\gamma$  79 °C y CD86 81 °C. Este proceso de RT-PCR se llevó a cabo en 45 min.

e. PCR anidada. Esta técnica se basó en la amplificación de la secuencia de la glicoproteína de la rabia empleando dos tipos de DNA cebadores: los primeros flanquearon una secuencia del gen de 777 y los s de 265 pares de

bases que estaba incluida dentro de la primera secuencia, de tal manera que el producto de la primera PCR se utilizó de muestra para realizar la segunda PCR de manera consecutiva -PCR anidada-. Para evitar resultados ambiguos se realizó una tercera PCR de tal manera que las bandas muy tenues y que se visualizaban con dificultad pudieran detectarse con facilidad. La secuencia de los cebadores empleados para realizar la reacción fueron las siguientes:

<b>Externos</b>	
Sentido	5'- CCT GGA GCC CGA TTG ACA TAC -3'
Anti-sentido	5'- ACA AGG TGC TCA ATT TCG TC -3'
<b>Internos</b>	
Sentido	5'- AAA GCA TTT CCG CCC AAC AC - 3'
Anti-sentido	5' -GGT TAC TGG AGC AGT AGG TAG A - 3'

TABLA 3. Primers o cebadores para PCR anidada.

Las muestras utilizadas para la PCR anidada consistieron en DNA y DNAC sintetizado a partir del RNA aislado de músculo gastrocnemio de ratones a los que se inoculó 150 µg de los plásmidos un m pSG5rab.gp y met pSG5rab.gp; Se utilizaron ratones no inoculados como control negativo de los que también se aisló RNA y DNA a partir de músculo. Las condiciones para la PCR anidada fueron las siguientes: 2 µL de DNAC y DNA se emplearon para la reacción de la polimerasa que consistió en una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min, seguida de 35 ciclos de amplificación a 94 °C por 1 min, 64 °C 1 min y 72 °C 1

---

min; posteriormente se tomaron 0.3  $\mu$ L del producto y se emplearon para realizar una segunda PCR con condiciones similares y con la única diferencia en el tiempo de alargamiento a 72 °C que en este caso fue de 50 s. Para cada ciclo se incluyó un control negativo al que se adicionó agua en sustitución de la muestra. Los productos de ambas reacciones se analizaron mediante corrimiento en geles de agarosa al 1% y se visualizaron en un transiluminador. Posteriormente la fluorescencia de las bandas se cuantificó con un escáner para fluorescencia y mediante el programa computacional "imagequant 5". La sensibilidad de la PCR anidada se determinó mediante la amplificación de una curva estandar preparada con DNA del gen de la glicoproteína de la rabia para el cual se calculó la concentración en número de copias y se realizaron diluciones seriadas a partir de 10 millones de copias y hasta una copia del gen.

### 3. Manejo de ratones.

a. Vacunación. Los animales se dividieron en grupos de cinco. Se inocularon en ambos músculos cuádriceps 10  $\mu$ g de DNA plasmídico (metilado y no metilado, en diferentes grupos) disuelto en 100  $\mu$ l de agua libre de endotoxina. Los ratones fueron re-inoculados a las 8 semanas siguiendo dos protocolos distintos. En el primero de ellos, la re-inmunización fue homóloga, es decir con el mismo vector empleado inicialmente. El segundo protocolo consistió en una re-inmunización heteróloga, en la que todos los grupos fueron inyectados con el vector pSG5rab.gp no metilado. En todos los casos se utilizó un grupo como control negativo inoculado solamente

---

con el vector sin el transgén. El DNA se inyectó en 100  $\mu$ L de agua libre de endotoxina.

- b. Obtención de sangre. Los ratones fueron sangrados por punción retro-orbital utilizando capilares Netelson. Las muestras se incubaron durante 40 min a temperatura ambiente. Se centrifugaron por 25 min a 1020 x g. El plasma se mantuvo a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

#### 4. Pruebas inmunológicas.

- a. ELISA para la determinación de anticuerpos anti-rab.gp (glicoproteína del virus de la rabia). Se utilizaron placas de ELISA de 96 pozos previamente cubiertos con el virus inactivado de la rabia ERA-BPL. Se adicionaron en duplicado 200  $\mu$ L de suero diluido 1:200 en PBS-BSA al 3%. Se hicieron ocho diluciones seriadas 1:2 en PBS-BSA. La última dilución de suero control negativo de ratones inoculados con el vector sin el gen rab.gp se utilizó como blanco. La placa se incubó a temperatura ambiente durante una hora, se lavó tres veces con PBS-Tween y se adicionaron 60  $\mu$ L de anticuerpos de cabra vs ratón, diluidos previamente 1:150 en PBS-BSA. La placa se incubó durante una hora a temperatura ambiente, se lavó cuatro veces con PBS y se adicionaron 100  $\mu$ L del sustrato de la fosfatasa en cada pozo. Se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y se leyó la absorbancia a 405 nm en un lector de ELISA.
- b. ELISA para la determinación de isotipos de inmunoglobulinas anti-rab.gp. Se utilizaron placas de ELISA de 96 pozos previamente cubiertos con el virus inactivado de la rabia ERA-BPL. Se adicionaron 100  $\mu$ L por pozo de

---

suero de ratones diluido previamente 1:400 en PBS-BSA. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante una hora. Se lavaron tres veces con PBS y se adicionaron dos gotas (aproximadamente 100  $\mu$ l) de anticuerpos de conejo anti-IgA, IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3; todos ellos pertenecientes a un equipo para la determinación del sub-isotipo de anticuerpos de hibridoma. Las placas se incubaron durante una hora a temperatura ambiente, se lavaron tres veces con PBS, se adicionaron 100  $\mu$ L de anticuerpos de cabra vs conejo conjugados con peroxidasa, previamente diluidos 1:4000 en PBS con agente surfactante. Se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min, se lavaron 4 veces con PBS con surfactante. Se adicionaron 100  $\mu$ L de sustrato TMB, se incubaron por 5 min y se agregó un volumen de 100  $\mu$ l de ácido clorhídrico 250 mM. La absorbancia se leyó a 450 nm en un lector de ELISA.

- c. ELISA para la cuantificación de las citocinas IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$  secretadas por esplenocitos de ratones previamente inoculados con vacunas de DNA. Placas de ELISA de 96 pozos se cubrieron con 50  $\mu$ L de amortiguador de bicarbonato, pH 9.6 que contenían el anticuerpo correspondiente anti-IFN- $\gamma$ , anti-IL-2 o anti-IL-4 una concentración de 2  $\mu$ g/mL; Las placas se incubaron durante toda la noche a 4°C. Se lavaron dos veces con PBS-Tween; Los pozos se bloquearon con 200  $\mu$ L de PBS-BSA al 3% durante la noche a 4°C y se lavaron dos veces con PBS-Tween; Se adicionaron 100  $\mu$ L de los sobrenadantes de esplenocitos previamente estimulados con el virus inactivado de la rabia ERA-BPL. En la misma placa se colocaron estándares

---

con concentraciones conocidas de IL-2, IL-4 e IFN- $\gamma$ ; se incubaron a 4°C durante la noche; los pozos se lavaron con PBS-Tween y se adicionaron 100  $\mu$ L por pozo de anticuerpos anti-IL-2, anti-IL-4 y anti-IFN- $\gamma$  marcados con biotina en la placa correspondiente; se incubaron a temperatura ambiente durante 45 min; se lavaron 6 veces con PBS-Tween; se adicionaron 100  $\mu$ L de una dilución 1:500 de avidina peroxidasa; se incubó durante 2 h a temperatura ambiente; la placa se lavó 8 veces y se agregaron 100  $\mu$ L de sustrato TMB; se leyó la absorbancia a 650 nm, o en caso necesario se adicionaron 100  $\mu$ l de ácido clorhídrico 250 mM y se leyó a 450 nm.

- d. Ensayo de citotoxicidad de linfocitos. Ratones de la cepa C3H/He fueron sacrificados a la semana 8 después de haber sido inoculados en una segunda ocasión con DNA no metilado. Los esplenocitos se extrajeron y se disgregaron en mallas; se lavaron 2 veces en medio L-15 y se contaron en cámaras de Neubauer; se resuspendieron en medio MLC al 2% y se adicionaron  $6 \times 10^6$  células por pozo en placas de cultivo de 24 pozos; se adicionaron  $6 \times 10^5$  unidades formadoras de placas (PFU) por pozo de adenovirus recombinante conteniendo el gen rab.gp; las placas se incubaron durante 5 días a 37°C en ambiente con 10% de CO<sub>2</sub>; al quinto día de incubación, se prepararon células blanco L929 transfectadas de manera estable con los vectores pSG5rab.gp (L929 a8); pSG5 (L929 c5); y L929 no transfectadas como control;  $1 \times 10^6$  células blanco se incubaron con <sup>51</sup>Cr durante 1 hora a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>; las células se lavaron 3 veces con medio

---

RPMI-1640 con 10% FBS y se preparó una suspensión de  $5 \times 10^4$  células por mililitro; los esplenocitos, o células efectoras se cosecharon y lavaron 3 veces con medio RPMI-1640 completo; se suspendieron en el mismo medio y se ajustó la concentración a  $5 \times 10^6$  células/mL. Se adicionaron en triplicado 100  $\mu$ L de la suspensión en placas de 96 pozos en forma de U; se hicieron 4 diluciones seriadas 1:2 para cada muestra y se adicionaron 100  $\mu$ L de la suspensión de células blanco a cada pozo; los controles positivos consistieron de células blanco a las que se adicionó SDS al 1%; y los controles negativos se hicieron con células blanco y 100  $\mu$ L de medio RPMI-1640 completo. Las placas se centrifugaron durante 30 s a 260 x g y se incubaron durante 5 h a 37°C en ambiente de CO<sub>2</sub> al 10%. Al término de la incubación, las placas se centrifugaron a 260 x g durante 3 min y se tomaron 100  $\mu$ L de los sobrenadantes que se analizaron en un contador de centelleo gamma.

- e. Ensayo biológico para determinar la respuesta T cooperadora (Th). A una suspensión con esplenocitos en medio MLC al 2% se adicionaron  $6 \times 10^6$  células/pozo en placas de 24 pozos en cuadruplicado. Se adicionó medio que contenía 10  $\mu$ g/mL de ERA-BPL a dos pozos de cada muestra. Las placas se incubaron durante 48 h a 37°C y 10% CO<sub>2</sub>; los sobrenadantes se colectaron y se adicionaron 75  $\mu$ L a placas de 96 pozos en triplicado; se agregó un volumen de 75  $\mu$ L de medio MLC con FBS al 20%, el cual contenía  $2 \times 10^3$  células HT-2 que requieren IL-2 para proliferar. Se utilizó un control positivo con células HT-2 y RCAS como agente estimulante, y un

---

control negativo con células y medio solamente. Las células se incubaron durante 3 días. Posteriormente se adicionó 1 mCi por pozo de timidina tritiada ( $^3\text{H}$ ) en 50  $\mu\text{L}$  de medio MLC al 2%; las células se incubaron durante 6 h a  $37^\circ\text{C}$ , se colectaron en filtros y se determinó la cantidad de  $^3\text{H}$  incorporada, la cual se toma como un indicador del grado de proliferación de los esplenocitos causado por la exposición *in vitro* al antígeno con el cual fueron vacunados previamente.

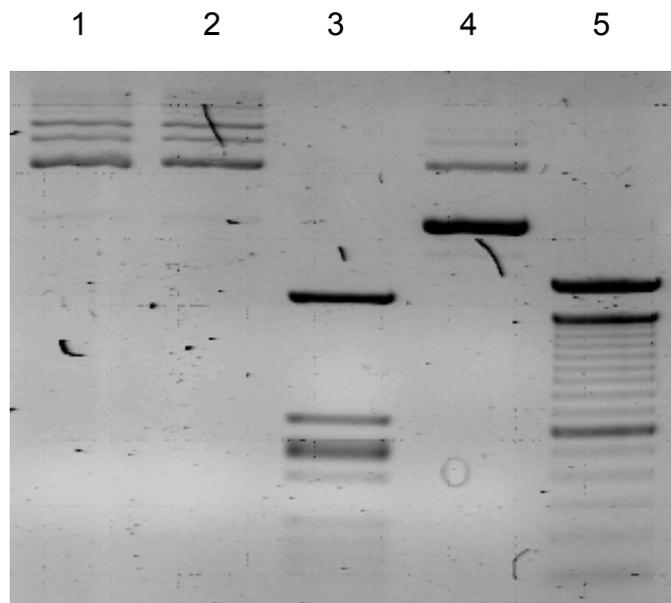
- f. Determinación de anticuerpos neutralizantes (VNAs) contra el virus de la rabia. Se empleó el virus ERA con capacidad infectiva en células BHK-21. El virus se incubó previamente con diferentes diluciones de suero de ratón, y se adicionó a una concentración de 1 PFU. Las células se incubaron en presencia del virus durante 24 h, se fijaron con acetona y se tiñeron con un anticuerpo contra la glicoproteína de la rabia marcado con fluoresceína. Los títulos se calcularon en base al recíproco de la dilución en la que se detectó una disminución en un 50% en la infección de células.

---

## RESULTADOS

### **COMPROBACIÓN DEL GRADO DE METILACIÓN DE LAS SECUENCIAS CpG MEDIANTE TRANSFECCIÓN DE BACTERIAS CON EL GEN DE LA METILASA.**

La metilación de las secuencias CpG del DNA puede realizarse mediante la incubación del DNA con la enzima metilasa aislada del microorganismo *Spiroplasma sp.* Es difícil alcanzar un buen grado de metilación mediante esta técnica debido a que se requiere una gran cantidad de enzima que metile suficiente DNA para inmunizar un ratón. Adicionalmente, la enzima tiene un costo muy elevado y el aislarla de bacterias es un proceso difícil en el que se obtiene una pequeña cantidad de ella. Lo anterior hace de esta una metodología con limitaciones para su utilización. Por ello se desarrolló en el laboratorio una tecnología alternativa para metilar el DNA en la que se utilizaron bacterias del género *E. coli* de la cepa ERI1821 que poseen el plásmido de baja capacidad de replicación pAIT-2, que contiene el gen que codifica para la enzima metilasa Sssl del microorganismo *Spiroplasma sp.* El plásmido pSG5rab.gp se introdujo en la bacteria *E. coli* ERI1821 y fue metilado durante el crecimiento de la misma. Debido a que el grado de metilación puede ser variable mediante las técnicas mencionadas con anterioridad, se verificó la magnitud de ésta mediante la incubación con la enzima de restricción Hpa II que degrada el DNA de manera inespecífica en las secuencias CpG no metiladas, dejando intactas las que se encuentran metiladas (Monti, Inga et al. 1999). El nivel de metilación alcanzado se muestra en la figura 1, en la que se puede observar que el DNA metilado no es digerido por la enzima Hpa II, mientras que el no metilado es cortado generando múltiples bandas.



**FIGURA 1. Corte mediante la enzima Hpa II para determinar el grado de metilación del vector plasmídico pSG5rab.gp.**

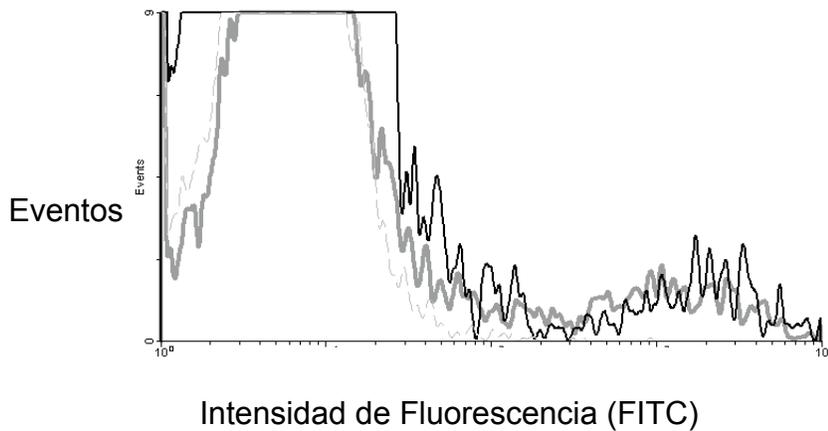
1  $\mu\text{g}$  de los vectores pSG5rab.gp no metilado y metilado se incubaron con la enzima Hpa II a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 h. Posteriormente, 100 ng de DNA fueron separados en geles de agarosa al 1%. Carril 1 y 2: vectores no metilado y metilado, respectivamente, sin exposición a la enzima; carriles 3 y 4: pSG5rab.gp no metilado y metilado, respectivamente posterior a la incubación con Hpa II; Carril 5: marcador de tamaño molecular de 100 pares de bases. El vector metilado, carril 4, no es degradado en magnitud considerable por la acción de la enzima, mientras que el no metilado en el carril 3 es cortado generando múltiples bandas de diferente tamaño.

---

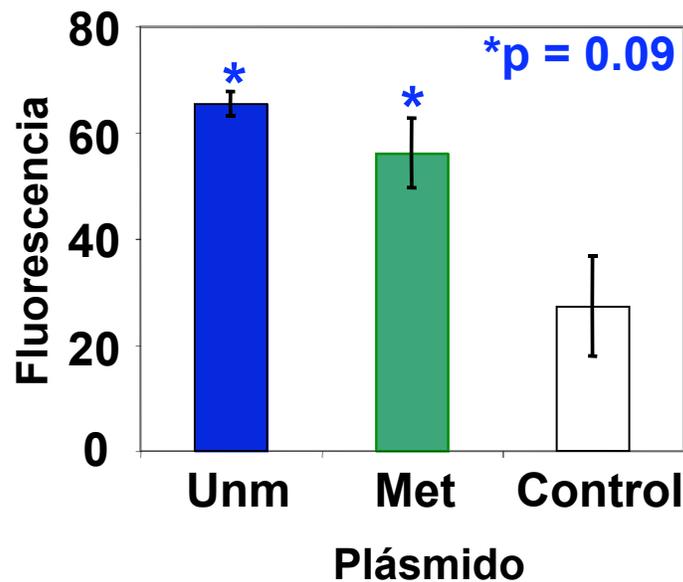
## ***EFEECTO DE LA METILACIÓN DE SECUENCIAS CpG SOBRE LA EXPRESIÓN GENÉTICA.***

La expresión genética es uno de los primeros análisis que deben de realizarse cuando se crea un nuevo vector plasmídico o en caso de modificaciones que se realicen a éste. La metilación en las secuencias CpG en regiones promotoras del DNA es un proceso que inhibe la expresión genética cuando se encuentra regulada por ciertos promotores (Mostoslavsky and Bergman 1997), aunque el promotor SV40 presente en el vector pSG5 no resulta afectado por la metilación. Por ello, la expresión de rab.gp se verificó mediante citometría de flujo en células transfectadas con los vectores metilados y no metilados. Como se observa en la figura 2, la expresión de rab.gp es menor en el vector metilado que en el no metilado, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas ( $p = 0.09$ ).

A



B



**FIGURA 2. Efecto de la metilación del vector pSG5rab.gp sobre la expresión del gen de la glicoproteína de la rabia.**

A) Células L929 fueron transfectadas con los vectores no metilado y metilado y la expresión de la glicoproteína de la rabia fue analizada mediante citometría de flujo. El histograma muestra la intensidad de fluorescencia en las células transfectadas con: Vector no metilado unmpSG5rab.gp (línea negra); vector metilado met pSG5rab.gp (línea gris) y vector pSG5 sin transgen (línea punteada).

B) Comparación entre intensidades de fluorescencia en células transfectadas con vectores no metilado (unm), metilado (met) y vector sin transgén. No hubo diferencias estadísticamente significativas entre vector no metilado y metilado ( $p = 0.09$ ).

---

## ***EFFECTO DE LA METILACIÓN DE SECUENCIAS CpG SOBRE LA RESPUESTA INMUNE.***

### **Respuesta inmune humoral**

La respuesta inmune humoral fue valorada tras una sola inmunización con los diferentes vectores a dosis bajas de 10  $\mu$ g (Figura 3A); a dosis altas de 300  $\mu$ g (Figura 3C); de manera posterior a una doble inmunización con el mismo tipo de vector en ambas ocasiones a dosis bajas, llamado también refuerzo homólogo (Figura 3B); y finalmente tras una inyección inicial seguida de la inoculación con el vector no metilado –refuerzo heterólogo- (Figura 3D). La respuesta inmune humoral fue analizada mediante la técnica de ELISA para la detección de anticuerpos dirigidos a la glicoproteína del virus de la rabia. El análisis se realizó a las cuatro y ocho semanas después de inmunizar a los animales de laboratorio; y de nuevo a la cuarta y octava semana posterior a la inoculación de refuerzo.

La vacunación única a dosis bajas (Figura 3A) indujo la aparición de anticuerpos solamente con el vector pSG5rab.gp no metilado la cual fue estadísticamente significativa cuando se comparó con los dos tratamientos restantes, es decir, vector metilado y control tanto a las 4 ( $p < 0.005$ ) como a las 8 semanas ( $p < 0.05$ ). No hubo diferencias significativas entre el vector metilado y el control ( $p > 0.3$ ). Para confirmar que el vector metilado no induce respuesta inmune alguna a bajas dosis, los ratones fueron re-inoculados con el mismo vector empleado inicialmente, es decir, mediante refuerzo homólogo. De nuevo, el grupo inoculado con vector metilado no desarrolló anticuerpos (Figura 3B). Se analizó la respuesta por anticuerpos mediante la administración de dosis

---

altas del vector plasmídico (Figura 3C), y se determinó que 300  $\mu$ g del vector metilado son capaces de generar una respuesta humoral hacia la glicoproteína de la rabia mayor que la de un control negativo, aunque la respuesta es considerablemente menor que la inducida por el vector no metilado a las cuatro y ocho semanas.

Para determinar si el tratamiento inicial con el vector metilado pSG5rab.gp a bajas dosis es capaz de inducir tolerancia, los ratones fueron re-inoculados con 50  $\mu$ g de vector no metilado y la respuesta humoral fue analizada (Figura 3D). De manera interesante, a las 4 semanas solamente el vector no metilado y el control re-inoculado con dicho vector generaron anticuerpos, mientras que la respuesta por el vector metilado se mantuvo de manera similar al control negativo. Sin embargo, a las 8 semanas todos los tratamientos indujeron anticuerpos, aunque el DNA metilado se mantuvo por debajo del no metilado y del control con la re-inmunización pero por arriba del control negativo ( $p < 0.002$ ).

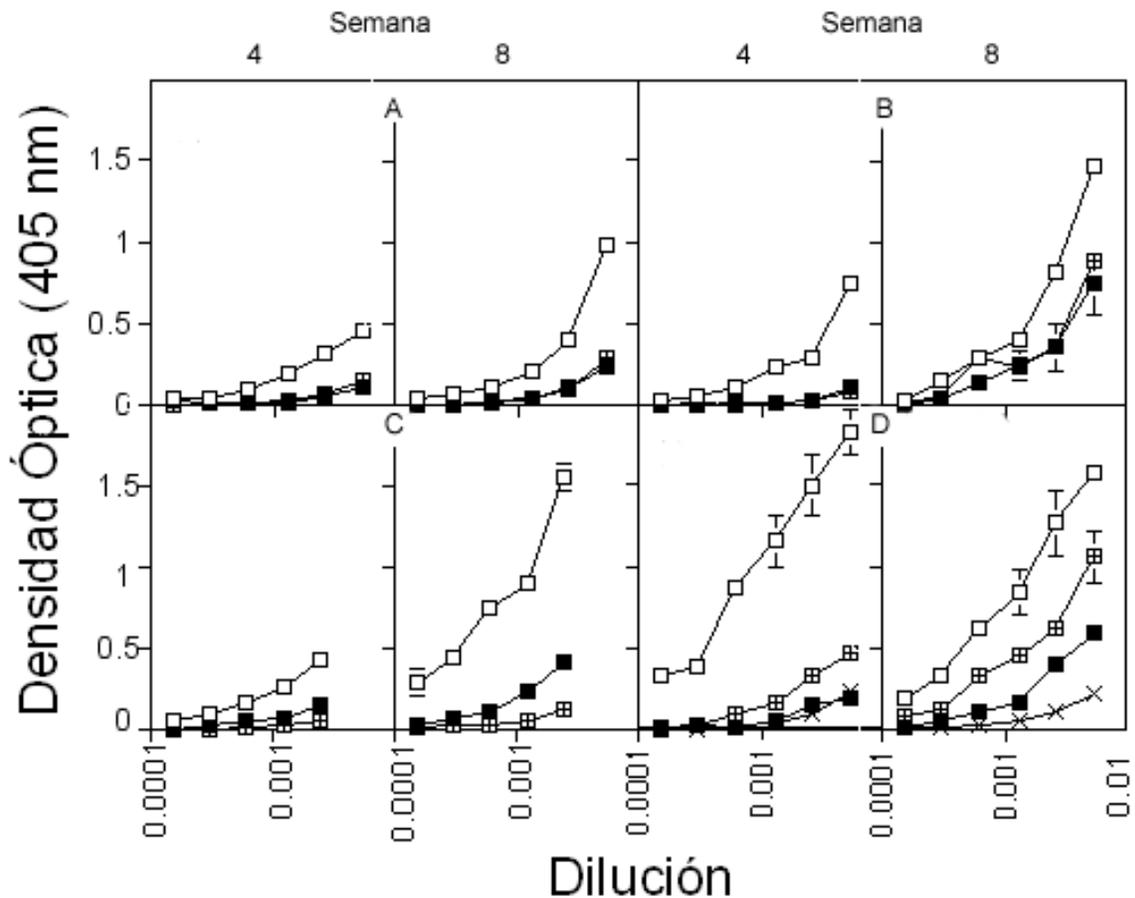


FIGURA 3. Respuesta inmune humoral hacia la glicoproteína de la rabia al inyectar vectores no metilados y metilados. (A) Posterior a una sola inmunización a dosis bajas de 10  $\mu$ g; (B) Vacunación homóloga con bajas dosis de 10  $\mu$ g en la que los ratones se re-inocularon con el mismo tipo de vector utilizado inicialmente. (C) Inmunización con dosis elevadas de 300  $\mu$ g por ratón.; (D) Vacunación heteróloga. Los ratones fueron inoculados inicialmente con vectores no metilado, metilado y esqueleto plasmídico (10  $\mu$ g) y posteriormente con vector no metilado para determinar inducción de tolerancia inmunológica. Símbolos: pSG5rab.gp no metilado ( □ ); pSG5rab.gp metilado ( ■ ); vector pSG5 + Unm pSG5rab.gp ( ▣ ); pSG5 ( x ).

---

## **Isotipo de anticuerpos generados por vectores metilados y no metilados.**

Las secuencias inmunoestimuladoras CpG actúan como adyuvantes internos en las vacunas de DNA ya que interactúan con células del sistema inmune innato activándolo y provocando una respuesta de tipo  $T_H1$ . Esta se caracteriza en ratones, entre otras, por la producción de anticuerpos del isotipo IgG2a; mientras que las respuestas  $T_H2$  generan anticuerpos del isotipo IgG1 (Snapper, Marcu et al. 1997).

Se determinó si la vacunación con el vector plasmídico metilado afecta no solamente en la magnitud de anticuerpos generados contra la proteína codificada, sino también en el isotipo de inmunoglobulinas (Figura 4). Los isotipos de anticuerpos IgG1 e IgG2a fueron determinados mediante la técnica de ELISA en la octava semana después de la vacunación de refuerzo heteróloga. El isotipo predominante en todos los grupos de ratones re-inmunizados fue del tipo IgG2a. Esto indica que el tipo de respuesta inmune cooperadora no varía debido a la vacunación inicial con un vector metilado, la cual tiende a ser en todos los casos de tipo  $T_H1$ .

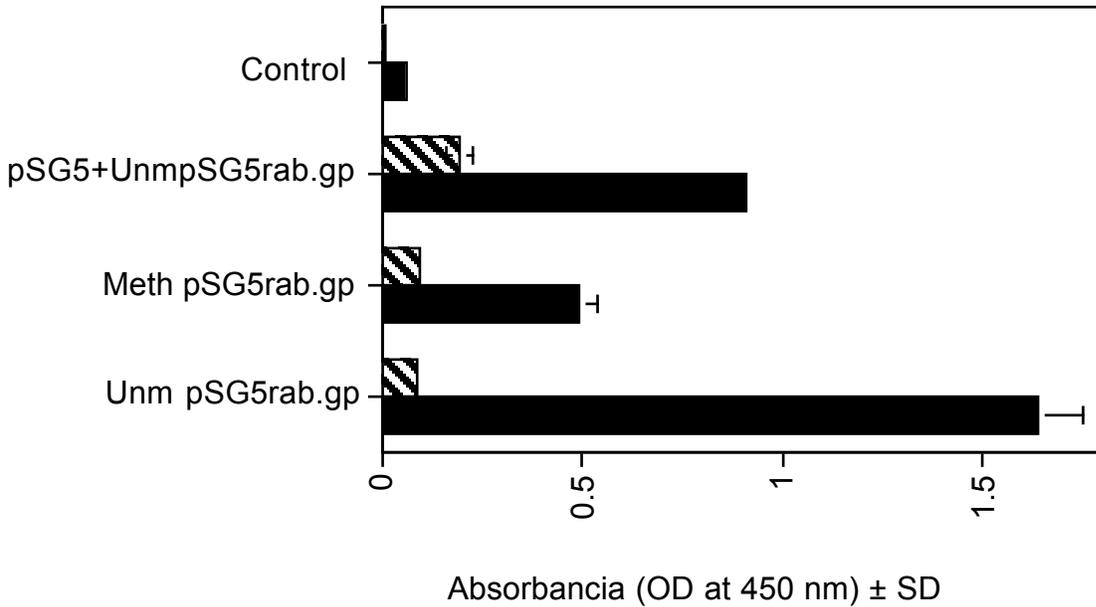


FIGURA 4. Efecto de la inoculación inicial con vector metilado sobre los isotipos de anticuerpos generados tras la posterior vacunación con un vector no metilado. Isotipo IgG1 ( ▨ ); isotipo IgG2a ( ■ ).

### Anticuerpos neutralizantes virales

El vector plasmídico pSG5rab.gp induce la formación de anticuerpos con capacidad de neutralizar el virus de la rabia y que eventualmente protegen a los ratones contra un reto que produce la muerte en ratones no vacunados (Xiang, Knowles et al. 1995). La determinación de VNAs en nuestro caso, permitió analizar las características de la respuesta humoral contra el virus de la rabia de manera adicional a la magnitud de la respuesta inmune determinada mediante ELISA. El título de VNAs fue menor en los ratones vacunados inicialmente con la vacuna metilada en comparación con el título observado en ratones con la vacuna no metilada y el control inoculado con el vector sin el

---

transgén (figura 5). Estos resultados siguen el mismo patrón observado en la determinación de anticuerpos mediante ELISA (figura 3), en la que el DNA metilado provocó una reducción en la respuesta humoral hacia la glicoproteína de la rabia.

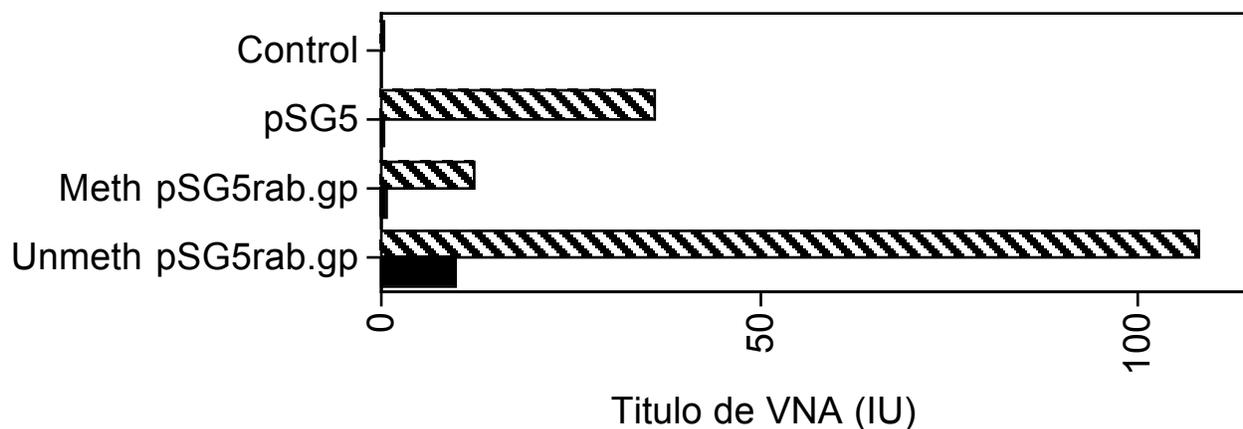


FIGURA 5. Determinación de anticuerpos neutralizantes (VNA) a las 4 semanas de inmunización (■) y a las 8 semanas de refuerzo heterólogo (▨).

### Respuesta inmune por linfocitos T cooperadores (T<sub>H</sub>)

Se analizó el efecto que sobre los linfocitos T<sub>H</sub> tiene la inoculación del vector metilado pSG5rab.gp previo a la vacunación heteróloga. El ensayo se realizó durante la fase de memoria –a la octava semana- posterior a una sola vacunación, así como después de un refuerzo heterólogo. A las ocho semanas, se aislaron esplenocitos y se estimularon con el virus de la rabia inactivado ERA-BPL, el cual sirvió como antígeno capaz de activar linfocitos T CD4+ a través del MHC II. Las citocinas IL-2 e IFN- $\gamma$  fueron detectadas solamente en el grupo vacunado por única vez con el vector no metilado. Por otro lado, la estimulación *in vitro* provocó la secreción de citocinas en todos los grupos

inmunizados de manera heteróloga, aunque el grupo con vector metilado secretó citocinas en cantidades significativamente menores que los grupos no metilado ( $p = 0.02$ ) y control con refuerzo ( $p = 0.05$ ). La citocina IL-4 característica de la respuesta  $T_H2$  no fue detectada en ninguno de los tratamientos, confirmando los resultados obtenidos en el isotipo de anticuerpos, en el que la respuesta predominante fue de tipo  $T_H1$ .

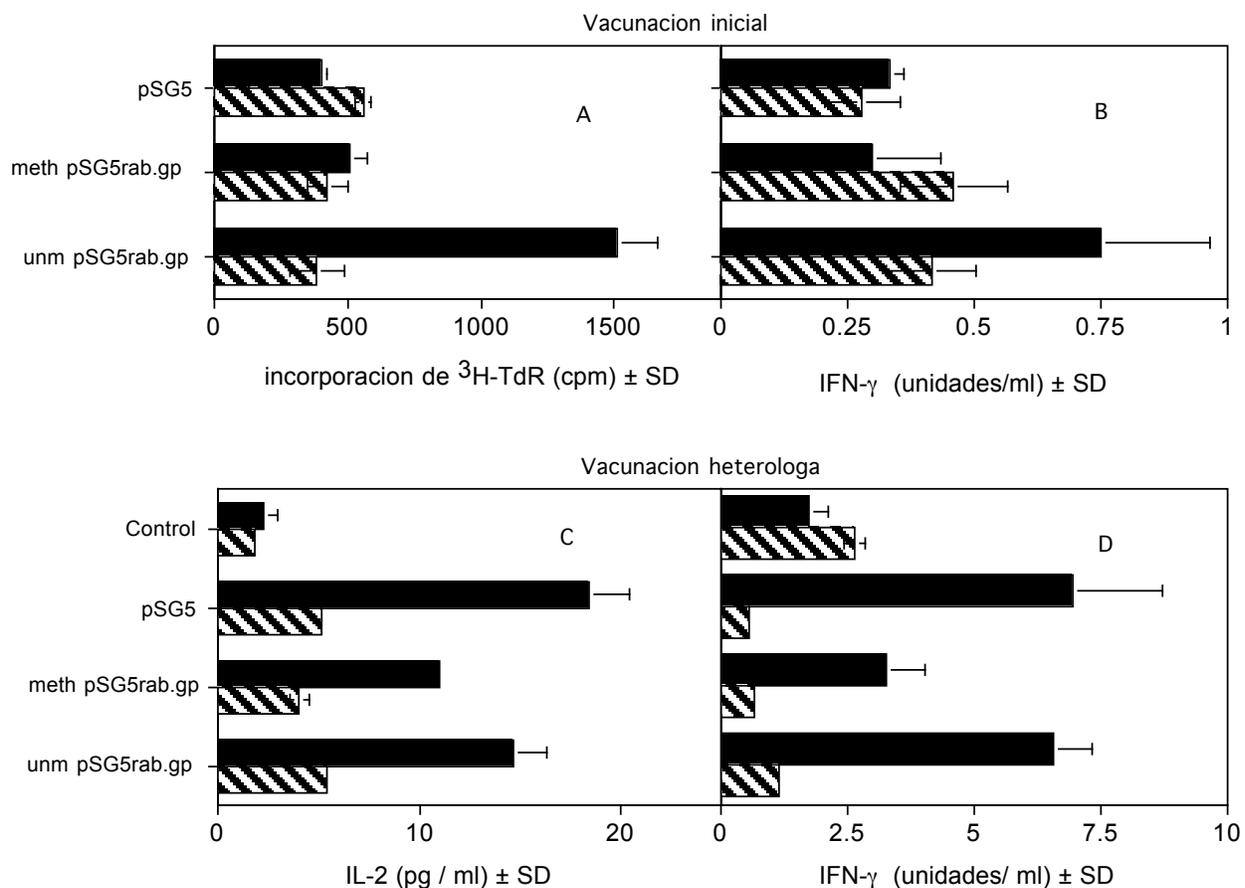


FIGURA 6. Secreción de citocinas hacia el medio de cultivo por parte de esplenocitos de ratones inoculados con vectores metilados y no metilados. (A) y (B), determinación de IL-2 e IFN- $\gamma$  después de una sola vacunación. (C) y (D), ensayo realizado a la octava semana de refuerzo heterólogo, con el vector unm pSG5rab.gp. La estimulación de los esplenocitos se realizó con antígeno del virus de la rabia inactivado y se muestra en la gráfica mediante barras negras; la secreción de citocinas basal sin estímulo antigénico se indica por barras con diagonales.

---

## **Efecto de la metilación del vector plasmídico sobre el tráfico de células presentadoras de antígeno**

Para analizar el papel que las secuencias CpG metiladas desempeñan en el tráfico de APCs, así como en la activación de linfocitos T y B se cuantificó en ganglios linfáticos el DNA plasmídico, la expresión de la proteína transgénica rab.gp y la de moléculas que influyen en la magnitud de la respuesta inmune, como IFN- $\gamma$  y CD 86.

El DNA y los diferentes transcritos de RNA fueron cuantificados en ganglios linfáticos mediante PCR y RT-PCR cuantitativa en tiempo real –técnica de PCR cuantitativa en la que es posible hacer un seguimiento o visualizar la cantidad de DNA durante la amplificación-.

La cantidad de DNA plasmídico transportada a ganglios linfáticos fue mayor con la vacuna no metilada que con la metilada ( $p < 0.05$ ) (figura 7). De manera interesante se observó que también el DNA metilado es capaz de viajar a los ganglios linfáticos presumiblemente transportado por APCs, ya que a través de la cuantificación se determinó una cantidad 25 veces mayor que la del control negativo ( $p < 0.005$ ), cuyos valores son debidos a fluorescencia inespecífica. A pesar de que el DNA plasmídico metilado llega a ganglios linfáticos en menores cantidades que el no metilado, la expresión de la proteína transgénica analizada a través de la cantidad de transcritos de RNA de rab.gp alcanzó niveles semejantes en ambos ( $p = 0.45$ ) (figura 7). Para determinar la causa que origina el que con una menor cantidad de DNA se alcancen niveles idénticos de expresión genética, se cuantificó la expresión de IFN- $\gamma$ , una proteína inflamatoria que provoca la disminución en la transcripción de genes que se encuentran bajo la influencia de promotores como el de CMV ó SV40, éste último presente en el vector pSG5rab.gp (Harms and Splitter 1995). La inyección de plásmido no metilado

indujo la expresión de mayores cantidades de IFN- $\gamma$  que la de DNA metilado ( $p < 0.005$ ), aunque éste último también fue mayor que el control negativo ( $p < 0.0005$ ) (figura 7). Adicionalmente se cuantificaron los transcritos de CD 86, una molécula coestimuladora presente en las APCs. La cantidad de transcritos de RNA de CD 86 se incrementó de manera significativa solamente como consecuencia de la inyección de DNA no metilado ( $p < 0.0001$ ), mientras que el control negativo y el DNA metilado tuvieron cantidades semejantes de RNA de CD 86 ( $p = 0.4$ ) (Figura 7).

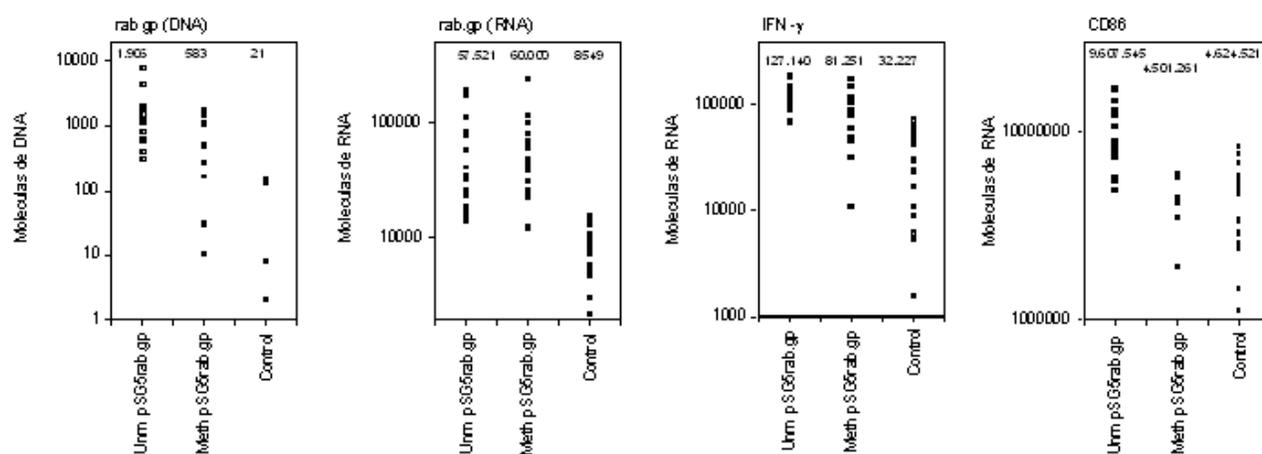


FIGURA 7. Cuantificación de DNA y RNA en ganglios linfáticos mediante PCR y RT-PCR. Los valores son expresados en base a una cantidad conocida de moléculas de un gen constitutivo (GAPD). La cantidad de DNA de rab.gp indicada es relativa a  $1 \times 10^9$  moléculas de GAPD, mientras que el RNA del resto de las moléculas es en base a  $1 \times 10^6$ . Las medias aritméticas se indican en la parte superior de cada gráfica.

La cuantificación de DNA de rab.gp indicó que el vector plasmídico es transportado a ganglios linfáticos en mayor cantidad cuando se inyecta un vector no metilado. Para determinar si las diferencias en la cantidad de DNA del vector en ganglios linfáticos son

---

consecuencia de un menor transporte de la vacuna metilada y no a un fenómeno de inhibición de la PCR debido a la metilación, se realizó una PCR cuantitativa con diferentes cantidades de DNA que se adicionaron a extractos de ganglios linfáticos, esto último para descartar la presencia de inhibidores. Como se observa en la figura 8, el DNA es amplificado de manera similar independientemente de la metilación.

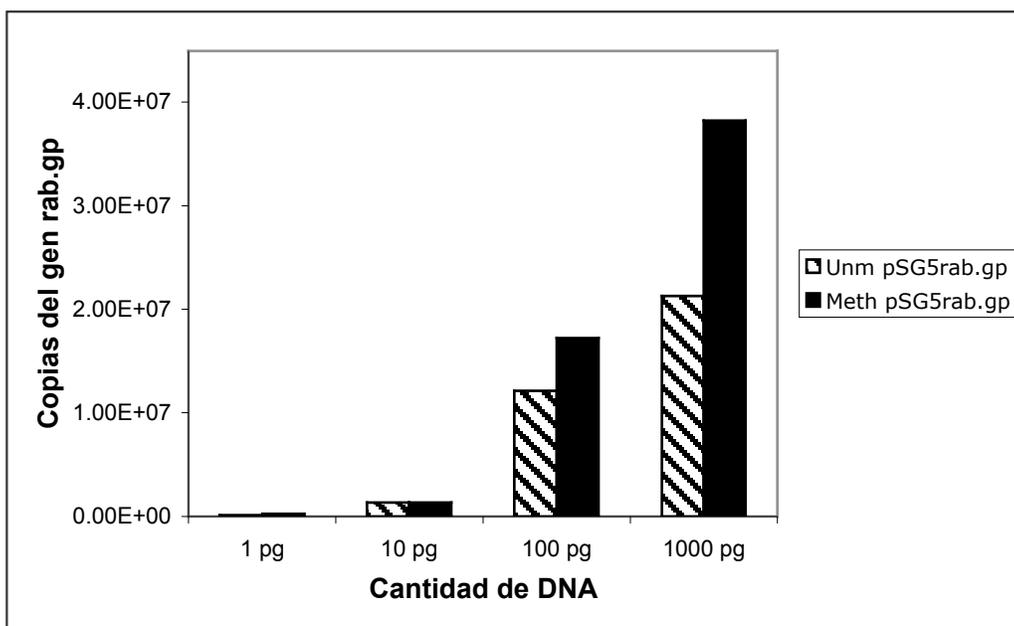


Figura 8. Amplificación por PCR de DNA plasmídico metilado y no metilado en presencia de extractos de ganglios linfáticos.

---

## **Reestablecimiento de la respuesta inmune mediante inoculación de un vector viral recombinante que expresa la glicoproteína de la rabia.**

Los vectores virales como los adenovirus inducen respuestas inmunes más potentes que los vectores plasmídicos. Para analizar si el vector metilado es capaz de inducir un estado de tolerancia inmunológica que no sea revertido por un estímulo fuerte, así como para confirmar o eliminar la posibilidad de un mecanismo de tolerancia por deleción clonal, se inyectó el vector AdH5rab.gp a ratones que inicialmente fueron inoculados con vectores plasmídicos no metilados y metilados.

Los resultados de la figura 9 nos indican que el tratamiento inicial con una vacuna metilada no provoca tolerancia o una disminución en la respuesta inmune por la posterior vacunación con AdH5rab.gp, ya que tanto a las diferentes dosis de adenovirus la glicoproteína de la rabia parece ser ignorada por el sistema inmune en los primeros días, sin embargo, posteriormente la respuesta inmune es de igual magnitud a la que se presenta en el grupo control vacunado inicialmente con el vector sin transgén.

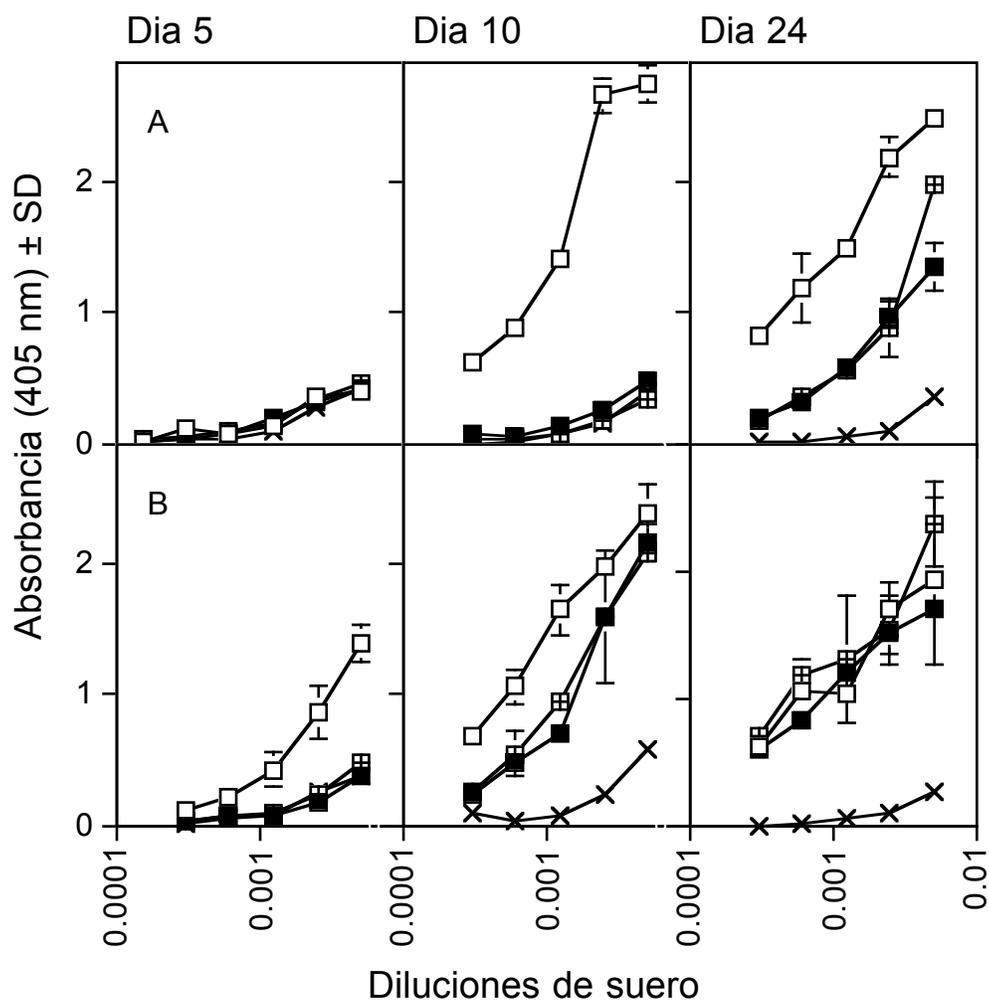


FIGURA 9. Anticuerpos dirigidos hacia la glicoproteína de la rabia mediante la inyección sucesiva de vectores plasmídicos con diferencias en metilación y vectores virales recombinantes expresando la misma proteína. El tratamiento inicial consistió en la inoculación con vectores pSG5rab.gp no metilado ( □ ), metilado ( ■ ) y vector vacío ( ⊞ ). A la octava semana, los ratones se reinocularon con  
 A) Dosis bajas de  $1 \times 10^4$  pfu de adenovirus recombinante AdH5rab.gp  
 B) Dosis altas de  $5 \times 10^4$  pfu de AdH5rab.gp.  
 Se utilizó un control negativo inoculado solamente con vector sin el transgén ( x ).

---

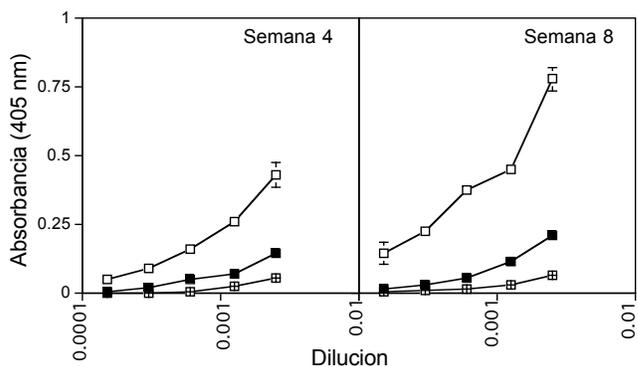
## **Efecto de la respuesta inmune sobre la expresión a largo plazo de la proteína transgénica**

Se analizó el papel que desempeña la respuesta inmune en la expresión a largo plazo de proteínas transgénicas. Dicha expresión se determinó en músculo de ratones inoculados con el vector pSG5rab.gp metilado y no metilado en un tiempo de 4 y 8 semanas posterior a la inoculación de los vectores plasmídicos. La respuesta inmune humoral se valoró de manera paralela para determinar las diferencias en cuanto al empleo de ambos plásmidos. Como se observa en la figura 10A, la inyección de 300  $\mu$ g de DNA por ratón provocó la aparición de anticuerpos tanto en el grupo al que se inoculó vector metilado como con el no metilado. Aunque para ambos grupos los valores fueron significativamente mas elevados que el control, la respuesta inmune por el vector no metilado fue significativamente mas elevada que por su contraparte metilada ( $p < 0.005$ ) (figura 10A).

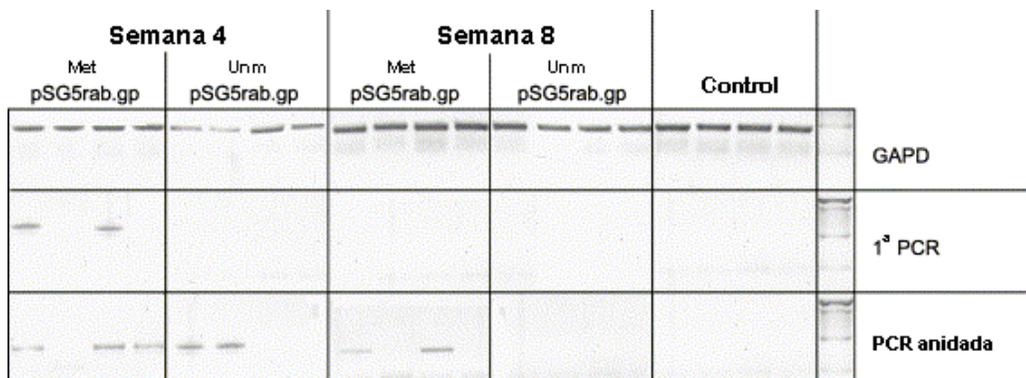
Se aisló DNA y RNA a partir de los músculos inoculados con los diferentes vectores. Se sintetizó DNAc a partir de RNA y las muestras se sometieron a tres PCR consecutivas. Los resultados con DNA fueron negativos para todas las muestras y sólo se detectó DNAc en las muestras analizadas. Como se observa en la figura 10B, después de una primera amplificación solamente 50% las muestras de DNAc del grupo con vector metilado fueron positivas, mientras que al incrementar la sensibilidad de la reacción con una segunda y tercera PCR se observó que a la cuarta semana de inoculación 75% de las muestras con vector metilado fueron positivas mientras que solo el 50% de aquellas con vector no metilado arrojaron el mismo resultado. A la octava semana solamente 50% de las muestras con vector metilado expresaron el gen mientras que con el vector no

metilado fueron negativas en su totalidad. Las intensidades de fluorescencia se muestran en la figura 10D. La sensibilidad de la PCR anidada fue determinada (figura 10C), observándose que con una primera PCR se pueden detectar por arriba de 10 000 copias de transcrito de la glicoproteína de la rabia, aunque la banda es muy tenue y no puede observarse con claridad en el esquema. Sin embargo, una segunda PCR permite detectar hasta 5 copias sin ambigüedad y una banda tenue correspondiente a 2 copias la cual resulta positiva tras una tercera PCR. Esta serie de tres reacciones incrementa la sensibilidad considerablemente en una magnitud de 5 000 veces sin afectar la especificidad de la prueba, como se puede comprobar los resultados negativos con la muestra que contiene agua.

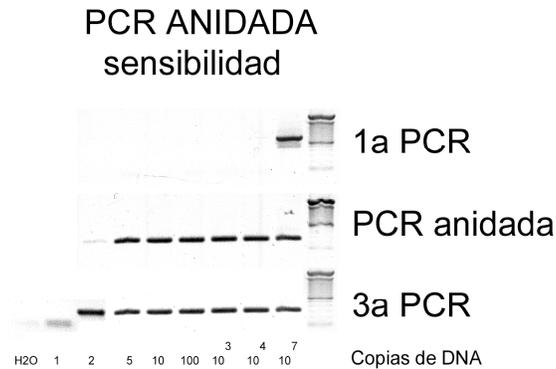
A



B



C



D

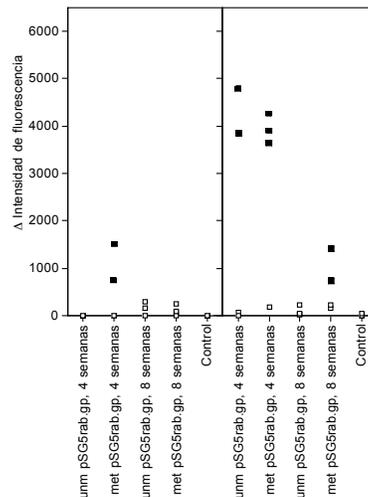


Figura 10. Efecto de la respuesta inmune sobre la expresión a largo plazo de la proteína transgénica *in vivo*. Ratones C3H/He fueron inoculados con 300  $\mu$ g de los vectores unm pSG5rab.gp, met pSG5rab.gp y pSG5 como control. .

- A) Se valoró la respuesta inmune por anticuerpos a las 4 y 8 semanas de la inoculación .  $\square$ unm pSG5 rab.gp;  $\blacksquare$ met pSG5 rab.gp;  $\square$ pSG5 sin DNA transgénico. Las diferencias fueron estadísticamente significativas al comparar unm vs met y met vs pSG5 ( $p < 0.005$ ); unm vs pSG5 ( $p < 0.001$ )
- B) Amplificación de DNAC mediante la técnica de PCR anidada en ratones inoculados con 150  $\mu$ g por músculo de vectores plasmídicos. El material genético fue aislado a las 4 y ocho semanas de inoculación.
- C)Sensibilidad de la PCR anidada.
- D)Cuantificación de la intensidad de fluorescencia en las muestras mostradas en 10B.

---

## DISCUSIÓN

En este estudio, se inoculó un vector plasmídico metilado para inducir tolerancia inmunológica específica para un antígeno codificado por el mismo vector. El objetivo a largo plazo es aplicar estos principios a terapias que involucran la administración de proteínas faltantes en el organismo, en especial aquellas que se producen como consecuencia de un tratamiento por terapia génica.

La metilación del DNA puede realizarse *in vitro* mediante la incubación del plásmido con la enzima metilasa de *Spiroplasma sp* (Matsuo, Silke et al. 1994). En nuestra experiencia el grado de metilación varía dependiendo de las condiciones en que ésta se realiza y es difícil metilar completamente las citosinas. Es importante lograr el máximo de metilación posible debido a que las células del sistema inmune innato son activadas de manera proporcional al número de secuencias CpG presentes. Por ello, desarrollamos un método de metilación que se basa en la transfección de nuestro plásmido en bacterias que poseen el gen que codifica para la metilasa Sssl. Nuestros resultados muestran un alto grado de metilación el cual se hizo evidente tras la incubación con la enzima Hpa II que corta el DNA de manera inespecífica en las secuencias CpG no metiladas y que en el caso del vector plasmídico metilado la degradación fue mínima, como se demostró en una separación del DNA en geles de agarosa (figura 1). Para determinar que la metilación no afecta la expresión del gen *rab.gp*, se realizó una transfección transitoria y se analizaron los niveles de expresión genética. Los niveles de expresión fueron similares para la vacuna metilada y no metilada descartando así la posibilidad de que las diferencias en la respuesta inmunológica fueran

---

debidas a los niveles de expresión de la proteína transgénica. En seguida se valoró la respuesta inmune tras la inoculación en ratones de los vectores metilados y no metilados.

En cuanto a la respuesta humoral la vacuna metilada no indujo la producción de anticuerpos después de 4 y 8 semanas de inoculación y posterior a una re-inmunización con la misma a bajas dosis. Sin embargo, a dosis altas la respuesta se presenta aunque en baja proporción. Se ha demostrado con anterioridad que las vacunas de DNA producen una respuesta inmune hacia la glicoproteína del virus de la rabia capaz de conferir protección ante un reto viral (Xiang, Spitalnik et al. 1994). Por ello se realizó una vacunación heteróloga con el vector no metilado con la finalidad de determinar si el tratamiento inicial con el vector metilado era capaz de inducir tolerancia. De manera interesante, no hubo producción de anticuerpos contra la glicoproteína a la cuarta semana de vacunación. Sin embargo se generaron títulos bajos a la octava semana. El análisis de VNAs confirmó que el tratamiento inicial con vector metilado disminuye la respuesta humoral hacia la proteína en cuestión aunque no la elimina por completo. Es posible que esto se deba a que la inoculación de una vacuna de DNA metilada induce un estado de anergia que es revertido fácilmente tras la inyección de la vacuna no metilada; otra explicación a éstos resultados podría ser que el antígeno es ignorado tras la inyección del vector metilado, y la posterior vacunación provoca una respuesta inmune hacia la proteína. Una tercera posibilidad que explique las diferencias en la respuesta humoral podría ser la alteración en el balance entre respuestas  $T_H1$  y  $T_H2$ . Lo anterior quedó descartado tras el análisis de los isotipos de anticuerpos generados ya que en todos los casos la inmunoglobulina predominante fue del tipo IgG2a la cual es característica de las respuestas  $T_H1$ . Adicionalmente, el análisis de las citocinas secretadas por linfocitos T reveló la ausencia de IL-4 en todos los grupos, y el grupo

---

tratado con vector metilado mostró menor producción de IFN- $\gamma$  e IL-2, lo cual indica que este tratamiento afectó la respuesta inmune producida por la vacunación con vector no metilado. Entre las diferencias que existen en el mecanismo de ignorancia inmunológica con respecto a la anergia, la principal radica en que en la primera, los linfocitos no desarrollan una respuesta inmune *in vivo*, aunque al estimularse *in vitro* son capaces de activarse, proliferar y secretar IL-2 al medio de cultivo. Por su parte, en el estado de anergia los linfocitos no producen dicha interleucina y existe incapacidad de proliferar (Garcia-Sanz and Lenig 1996).

Algunos vectores virales utilizados inicialmente para terapia génica han demostrado ser excelentes vacunas que provocan potentes respuestas inmunológicas capaces de proteger animales de experimentación contra retos virales. Tal es el caso de los adenovirus transgénicos como el AdH5rab.gp que expresa la glicoproteína del virus de la rabia y que induce respuestas superiores a las vacunas de DNA e incluso a otros vectores virales como la cepa vacunal de la viruela (Xiang, Yang et al. 1996). La respuesta es de tal magnitud que la aparición de anticuerpos es detectada en los primeros 5 días de vacunación. Las razones anteriores han llevado a buscar virus recombinantes alternativos con menor inmunogenicidad que posibiliten la terapia génica. Las características de estos vectores virales nos llevaron a analizar si el estado de anergia parcial mostrado por la vacuna metilada podría resistir una inmunización de dichas características.

Los resultados de la figura 9 nos indican que el tratamiento inicial con una vacuna metilada no provoca tolerancia completa o una disminución en la respuesta inmune por la vacunación posterior con AdH5rab.gp, ya que tanto a las diferentes dosis de adenovirus la glicoproteína de la rabia parece ser ignorada por el sistema inmune en los primeros

---

días, sin embargo, posteriormente la respuesta inmune es de igual magnitud a la que se presenta en el grupo control vacunado inicialmente con el vector vacío. Esto nos lleva a la conclusión de que el fenómeno producido por la vacuna metilada consiste en un estado de anergia parcial que puede revertirse por completo cuando la reestimulación es lo suficientemente fuerte. Adicionalmente, el hecho de que la respuesta inmune inducida por un vector metilado se recupere por la estimulación fuerte de un adenovirus recombinante, nos indica que no existe un fenómeno de tolerancia por delección clonal, ya que si éste fuera el caso, la respuesta inmune no habría alcanzado los niveles elevados de la vacuna no metilada. Sin embargo, con éste experimento no se descarta la presencia de linfocitos T supresores.

Para explicar la causa por la que la inyección de un vector metilado afecta la respuesta inmune hacia una proteína transgénica, se analizó el efecto que tiene la inoculación del plásmido metilado sobre el tráfico y la presentación de antígeno por las APCs en ganglios linfáticos. Para ello se utilizó la herramienta de la RT-PCR en tiempo real la cual nos permitió cuantificar al DNA plasmídico que fue transportado a ganglios linfáticos que drenan la zona inyectada, así como el RNA de moléculas que participan en la generación de la respuesta inmune. Las vacunas de DNA ejercen su efecto a través de la transfección de células presentes en el área inoculada, como las musculares y APCs inmaduras. La presencia de secuencias CpG provoca la activación y maduración de APCs, induciendo la expresión de moléculas como CCR 7 que les permiten viajar a ganglios linfáticos, así como CD 80 y CD 86 que participan en la activación de linfocitos T y B dirigidos hacia el antígeno presentado. Los resultados obtenidos nos indican que en efecto, la metilación de las secuencias CpG de la vacuna provocan que una menor cantidad de DNA llegue a los ganglios linfáticos. Sin embargo, esto no explica la

---

disminución de la respuesta inmune hacia la proteína transgénica, ya que ésta se expresó en los mismos niveles tanto en la vacuna metilada como en la no metilada. Este efecto está principalmente relacionado a la producción de IFN- $\gamma$  en los ganglios linfáticos, ya que se ha reportado que esta citocina disminuye la expresión de genes que se encuentran bajo el control de promotores como CMV y SV40, este último presente en la vacuna utilizada (Harms 1995). Debido a que la expresión de rab.gp fue igual en ambos vectores, se procedió a analizar la expresión de otras moléculas que pudieran explicar las diferencias en la respuesta inmune. De manera interesante, se determinó que la molécula coestimuladora CD 86 se expresó en niveles mayores en ganglios linfáticos por efecto del vector no metilado, mientras que la inyección de DNA metilado no aumentó su síntesis y se mantuvo al mismo nivel que el control. Esta observación concuerda con el dogma inicialmente establecido por Bretscher y Cohn (Bretscher and Cohn 1970), en el que se establece que la activación linfocitaria requiere de dos señales: la presentación de antígeno -1- y una molécula coestimuladora -2-; Matzinger (Matzinger 1994) postula que esta última es inducida por una señal de peligro que en el caso de una vacuna de DNA corresponde a la señal 0 emitida por las secuencias CpG inmunoestimuladoras no metiladas (Janeway 1989); y que cuando se presenta al antígeno en ausencia de la segunda señal, los linfocitos son tolerizados. En nuestros resultados es evidente que el antígeno se expresa en niveles iguales tras inocular una vacuna metilada y no metilada, mientras que la expresión diferencial de moléculas coestimuladoras dicta la pauta para generar una respuesta inmune o para evitar que ésta se produzca.

La anergia clonal es uno de los mecanismos por los que se asegura tolerancia hacia antígenos a los que no se tiene acceso en órganos linfoides primarios como el timo y que sólo se presentan en la periferia (Goodnow 1996). En el caso de los linfocitos T la

---

anergia se caracteriza por una falta de respuesta por parte de las células hacia la re-estimulación con APCs competentes (Levings, Bacchetta et al. 2002). Ésta es provocada por la ausencia de coestimulación cuando el receptor de células T (TCR) es activado. Las moléculas coestimuladoras involucradas en este proceso son las B7, como CD80 y CD86, las cuales interactúan con CD28 en la superficie de las células T provocando la producción de IL-2 (García-Sanz and Lenig 1996). La incapacidad de los linfocitos T para producir dicha citocina es lo que caracteriza un estado de anergia.

Nuestro sistema se adapta perfectamente a éste modelo, ya que se observó una disminución en la producción de IL-2 por parte de linfocitos T cooperadores como consecuencia de la vacunación con un vector metilado. Adicionalmente, se pudo comprobar la falta de coestimulación por parte de CD86 en ganglios linfáticos donde también se determinó la expresión y por lo tanto la presentación de antígeno. El estado de anergia inducido como consecuencia de la vacunación con DNA metilado no es completo, ya que la respuesta T cooperadora y la respuesta inmune humoral específica para el antígeno se recupera parcialmente al utilizar una vacuna no metilada, y de manera total cuando el estímulo es más fuerte, como sucedió al utilizar un vector adenoviral. Es posible que para generar tolerancia inmunológica de manera completa se requieran de mecanismos adicionales a los aquí inducidos como la delección clonal, la generación de células T supresoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, o la formación de células T reguladoras de tipo 1 que basan la supresión de respuestas inmunes en la producción de citocinas como TGF- $\beta$  e IL-10. En base a esto último sería interesante determinar el efecto de estas dos citocinas sobre nuestro sistema al administrarse como adyuvantes genéticos.

Por último, se determinó si las diferencias en los parámetros analizados en cuanto a la respuesta inmune humoral y celular, afectan la expresión genética a largo plazo de

---

proteínas transgénicas que en este caso se introducen a un organismo mediante vectores no metilados y metilados. Se ha demostrado con anterioridad que la expresión de proteínas transgénicas, como resultado de la terapia génica con vectores virales, es limitada en cuanto a duración debido principalmente a la respuesta inmune por linfocitos T citotóxicos que se encarga de eliminar a las células que expresan el antígeno en cuestión, así como las proteínas virales (Yang, Li et al. 1995; Yang, Jooss et al. 1996). Sin embargo, ha sido difícil evaluar el papel que desempeña la proteína transgénica *per se* sin el efecto del vector viral. Estudios han mostrado en ratones transgénicos con  $\beta$ -galactosidasa y que por esta razón existe tolerancia inmunológica hacia esta proteína, que la administración de un vector adenoviral “vacío” en cuanto a su genoma, es decir que carece de los genes virales pero que contiene los que codifican a  $\beta$ -galactosidasa, la expresión de la proteína transgénica se mantiene relativamente estable durante un largo periodo de tiempo mientras que en ratones no transgénicos es prácticamente eliminada en la mitad de tiempo. En cuanto a los ratones tolerizados, la disminución en la expresión genética con el tiempo puede deberse a la degradación del DNA administrado (Chen, Mack et al. 1997).

Nuestros resultados muestran un resultado similar al anterior, mediante el empleo de un modelo diferente. Se demostró que la administración de un gen mediante un vector metilado genera una respuesta inmune débil a pesar de la introducción en el organismo de grandes cantidades de vector. La expresión *in vivo* de la proteína transgénica fue al mismo tiempo mayor con un vector metilado que con su contraparte no metilada, ya que se detectó con una PCR en el 50% de los ratones y en 75% con una PCR anidada a las 4 semanas; el vector no metilado arrojó resultados positivos sólo en la segunda PCR en el 50% de los casos. Al analizarse la expresión en un período mayor de 8 semanas,

---

solamente se detectó en el 50% de los casos con el vector metilado y fue negativo con el no metilado. La mayor diferencia en ambos tratamientos la constituye la respuesta inmune generada por ambos vectores.

Finalmente, ésta metodología podría ser de utilidad para disminuir la respuesta inmune en protocolos de terapia génica en los que el vector viral utilizado no tenga la alta inmunogenicidad mostrada por los adenovirus, como pudieran ser los virus adeno asociados, permitiendo con ello la expresión de proteínas transgénicas durante un largo período de tiempo.

---

## CONCLUSIONES

La inyección de una vacuna de DNA metilada provoca la generación de una respuesta inmune de baja magnitud hacia la proteína transgénica que esta codifica. Se ha determinado que no se produce respuesta inmune de tipo celular y humoral tras el tratamiento repetido con bajas cantidades de dicho vector metilado. El tratamiento inicial con este tipo de vacuna provoca una disminución en la respuesta inmune, de manera posterior cuando se utiliza un vector no metilado, que bajo condiciones normales genera una fuerte respuesta inmunológica. Sin embargo, ésta última no se elimina por completo ya que ante un estímulo aún más fuerte consistente en un vector adenoviral la respuesta inmune se reestablece por completo. El isotipo de anticuerpos así como el patrón de citocinas producido por esplenocitos revela que las variaciones en la respuesta inmune no se deben a un cambio en el balance  $T_{H1}$  y  $T_{H2}$ . Por otro lado, la disminución en la producción de IL-2 por parte de esplenocitos estimulados por el antígeno indica un estado de anergia parcial, ya que dicha producción no se elimina de manera total. La cuantificación de CD86 en ganglios linfáticos drenantes permitió la identificación del fenómeno que provoca la anergia. Ello se debió a la falta de coestimulación durante la presentación del antígeno.

La baja respuesta inmune inducida por vectores metilados permite la expresión en mayor magnitud y durante un período de tiempo mayor de la proteína transgénica que cuando se favorece la respuesta inmune por vectores no metilados.

La utilización de vectores con secuencias CpG con metilación podrían ser de utilidad para emplearse en protocolos de terapia génica siempre y cuando el vector empleado de manera sucesiva no posea propiedades inflamatorias.

---

## BIBLIOGRAFIA

- Bauer, M., V. Redecke, et al. (2001). "Bacterial cpg-dna triggers activation and maturation of human cd11c(-), cd123(+) dendritic cells." *J Immunol* 166(8): 5000-7.
- Bretscher, P. and M. Cohn (1970). "A theory of self-nonsel self discrimination." *Science* 169(950): 1042-9.
- Chen, H. H., L. M. Mack, et al. (1997). "Persistence in muscle of an adenoviral vector that lacks all viral genes." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(5): 1645-50.
- Condon, C., S. C. Watkins, et al. (1996). "DNA-based immunization by in vivo transfection of dendritic cells." *Nat Med* 2(10): 1122-8.
- Connelly, S., J. Mount, et al. (1996). "Complete short-term correction of canine hemophilia A by in vivo gene therapy." *Blood* 88(10): 3846-53.
- Crystal, R. G. (1995). "Transfer of genes to humans: early lessons and obstacles to success." *Science* 270(5235): 404-10.
- DeMatteo, R. P., S. E. Raper, et al. (1995). "Gene transfer to the thymus. A means of abrogating the immune response to recombinant adenovirus." *Ann Surg* 222(3): 229-39; discussion 239-42.
- Fang, B., R. C. Eisensmith, et al. (1995). "Gene therapy for hemophilia B: host immunosuppression prolongs the therapeutic effect of adenovirus-mediated factor IX expression." *Hum Gene Ther* 6(8): 1039-44.
- Fearon, D. T. and R. M. Locksley (1996). "The instructive role of innate immunity in the acquired immune response." *Science* 272(5258): 50-3.
- Fisher, K. J., K. Jooss, et al. (1997). "Recombinant adeno-associated virus for muscle directed gene therapy." *Nat Med* 3(3): 306-12.
- Garcia-Sanz, J. A. and D. Lenig (1996). "Translational control of interleukin 2 messenger RNA as a molecular mechanism of T cell anergy." *J Exp Med* 184(1): 159-64.
- Goodnow, C. C. (1996). "Balancing immunity and tolerance: deleting and tuning lymphocyte repertoires." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6): 2264-71.
- Graham, F. L., J. Smiley, et al. (1977). "Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5." *J Gen Virol* 36(1): 59-74.

- 
- Green, P. M., A. J. Montandon, et al. (1991). "Genetics and molecular biology of haemophilias A and B." *Blood Coagul Fibrinolysis* 2(4): 539-65.
- Green, P. M., A. J. Montandon, et al. (1991). "Haemophilia B mutations in a complete Swedish population sample: a test of new strategy for the genetic counselling of diseases with high mutational heterogeneity." *Br J Haematol* 78(3): 390-7.
- Harms, J. S. and G. A. Splitter (1995). "Interferon-gamma inhibits transgene expression driven by SV40 or CMV promoters but augments expression driven by the mammalian MHC I promoter." *Hum Gene Ther* 6(10): 1291-7.
- Hartley, S. B., M. P. Cooke, et al. (1993). "Elimination of self-reactive B lymphocytes proceeds in two stages: arrested development and cell death." *Cell* 72(3): 325-35.
- Herzog, R. W., J. N. Hagstrom, et al. (1997). "Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(11): 5804-9.
- Hortelano, G., A. Al-Hendy, et al. (1996). "Delivery of human factor IX in mice by encapsulated recombinant myoblasts: a novel approach towards allogeneic gene therapy of hemophilia B." *Blood* 87(12): 5095-103.
- Hoyer, L. W. (1995). "Why do so many haemophilia A patients develop an inhibitor?" *Br J Haematol* 90(3): 498-501.
- Janeway, C. (1989). "Immunogenicity signals 1,2,3 ... and 0." *Immunol Today* 10(9): 283-6.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). "The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self." *Immunol Today* 13(1): 11-6.
- Janeway, C. A., Jr., C. C. Goodnow, et al. (1996). "Danger - pathogen on the premises! Immunological tolerance." *Curr Biol* 6(5): 519-22.
- Kappler, J. W., N. Roehm, et al. (1987). "T cell tolerance by clonal elimination in the thymus." *Cell* 49(2): 273-80.
- Kay, M. A., A. X. Holterman, et al. (1995). "Long-term hepatic adenovirus-mediated gene expression in mice following CTLA4Ig administration." *Nat Genet* 11(2): 191-7.
- Kay, M. A., D. Liu, et al. (1997). "Gene therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(24): 12744-6.

- 
- Kim, J. J., M. L. Bagarazzi, et al. (1997). "Engineering of in vivo immune responses to DNA immunization via codelivery of costimulatory molecule genes." *Nat Biotechnol* 15(7): 641-6.
- Klinman, D. M., G. Yamshchikov, et al. (1997). "Contribution of CpG motifs to the immunogenicity of DNA vaccines." *J Immunol* 158(8): 3635-9.
- Krieg, A. M. and H. Wagner (2000). "Causing a commotion in the blood: immunotherapy progresses from bacteria to bacterial DNA." *Immunol Today* 21(10): 521-6.
- Krieg, A. M., A. K. Yi, et al. (1995). "CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation." *Nature* 374(6522): 546-9.
- Lafferty, K. J. and A. J. Cunningham (1975). "A new analysis of allogeneic interactions." *Aust J Exp Biol Med Sci* 53(1): 27-42.
- Lakich, D., H. H. Kazazian, Jr., et al. (1993). "Inversions disrupting the factor VIII gene are a common cause of severe haemophilia A." *Nat Genet* 5(3): 236-41.
- Lee, M. G., M. A. Abina, et al. (1995). "The constitutive expression of the immunomodulatory gp19k protein in E1- , E3- adenoviral vectors strongly reduces the host cytotoxic T cell response against the vector." *Gene Ther* 2(4): 256-62.
- Lehrman, S. (1999). "Virus treatment questioned after gene therapy death." *Nature* 401(6753): 517-8.
- Levings, M. K., R. Bacchetta, et al. (2002). "The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells." *Int Arch Allergy Immunol* 129(4): 263-76.
- Matsuo, K., J. Silke, et al. (1994). "The CpG-specific methylase Sssl has topoisomerase activity in the presence of Mg<sup>2+</sup>." *Nucleic Acids Res* 22(24): 5354-9.
- Matzinger, P. (1994). "Tolerance, danger, and the extended family." *Annu Rev Immunol* 12: 991-1045.
- McCoy, R. D., B. L. Davidson, et al. (1995). "Expression of human interleukin-1 receptor antagonist in mouse lungs using a recombinant adenovirus: effects on vector-induced inflammation." *Gene Ther* 2(7): 437-42.
- Mondino, A., A. Khoruts, et al. (1996). "The anatomy of T-cell activation and tolerance." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6): 2245-52.

- 
- Monti, P., A. Inga, et al. (1999). "5-methylcytosine at HpaII sites in p53 is not hypermutable after UVC irradiation." *Mutat Res* 431(1): 93-103.
- Mostoslavsky, R. and Y. Bergman (1997). "DNA methylation: regulation of gene expression and role in the immune system." *Biochim Biophys Acta* 1333(1): F29-50.
- Nabel, G. J. (1999). "Development of optimized vectors for gene therapy." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(2): 324-6.
- Pasquini, S., H. Deng, et al. (1999). "The effect of CpG sequences on the B cell response to a viral glycoprotein encoded by a plasmid vector." *Gene Therapy* 6(8): 1448-55.
- Pisetsky, D. S., C. Reich, et al. (1995). "Immunological properties of bacterial DNA." *Ann N Y Acad Sci* 772: 152-63.
- Qin, L., Y. Ding, et al. (1997). "Adenovirus-mediated gene transfer of viral interleukin-10 inhibits the immune response to both alloantigen and adenoviral antigen." *Hum Gene Ther* 8(11): 1365-74.
- Robbins, P. D., H. Tahara, et al. (1998). "Viral vectors for gene therapy." *Trends Biotechnol* 16(1): 35-40.
- Sato, Y., M. Roman, et al. (1996). "Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization." *Science* 273(5273): 352-4.
- Schatzlein, A. G. (2001). "Non-viral vectors in cancer gene therapy: principles and progress." *Anticancer Drugs* 12(4): 275-304.
- Snapper, C. M., K. B. Marcu, et al. (1997). "The immunoglobulin class switch: beyond "accessibility"." *Immunity* 6(3): 217-23.
- Tighe, H., M. Corr, et al. (1998). "Gene vaccination: plasmid DNA is more than just a blueprint." *Immunol Today* 19(2): 89-97.
- Wang, Q. and M. H. Finer (1996). "Second-generation adenovirus vectors." *Nat Med* 2(6): 714-6.
- Wilson, J. M. (1996). "Adenoviruses as gene-delivery vehicles." *N Engl J Med* 334(18): 1185-7.
- Xiang, Z. Q., B. B. Knowles, et al. (1995). "Immune effector mechanisms required for protection to rabies virus." *Virology* 214(2): 398-404.

- 
- Xiang, Z. Q., S. Spitalnik, et al. (1994). "Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein gene induces protective immunity against rabies virus." *Virology* 199(1): 132-40.
- Xiang, Z. Q., Y. Yang, et al. (1996). "A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier." *Virology* 219(1): 220-7.
- Yang, Y., K. U. Jooss, et al. (1996). "Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo." *Gene Ther* 3(2): 137-44.
- Yang, Y., Q. Li, et al. (1995). "Cellular and humoral immune responses to viral antigens create barriers to lung-directed gene therapy with recombinant adenoviruses." *J Virol* 69(4): 2004-15.
- Zheng, L., G. Fisher, et al. (1995). "Induction of apoptosis in mature T cells by tumour necrosis factor." *Nature* 377(6547): 348-51.