

FUSIÓN DEL GEN *N* Y LA REGIÓN CODIFICADORA DE LOS SITIOS ANTIGÉNICOS II Y III DEL GEN *G* DEL VIRUS DE LA RABIA; UNA POSIBILIDAD EN VACUNAS DE DNA

Jiménez-Alberto A., Meléndez-Félix, A. & R. M. Ribas-Aparicio*.

Laboratorio de Producción y Control de Biológicos, Departamento de Microbiología, ENCB-IPN. Prol. Carpio y Plan de Ayala S/N Colonia Casco Santo Tomás, Delegación Miguel Hidalgo, México, D. F. C. P. 11340. Fax 0157296207.

*rribas@redipn.ipn.mx

Palabras clave: *rabia, vacuna de DNA, RT-PCR*

Introducción. La rabia es una de las zoonosis más importantes en México, y se encuentra dentro de las prioridades en prevención y control, siendo una de las estrategias a seguir, la promoción de la vacunación antirrábica y el control de los reservorios transmisores (1). La presencia constante de brotes de rabia evidencia la importancia de la incursión en el desarrollo de nuevos productos biológicos en su prevención, los cuales apoyen los ya existentes. Actualmente se ha incursionado en el desarrollo de vacunas de DNA, las cuales por su producción de relativamente bajo costo, su capacidad de inducir un amplio espectro de respuestas inmunes celulares y humoral de larga duración y su carácter termoestable (el cual facilita su uso en áreas de clima tropical), constituyen una buena opción. Adicionalmente, el virus de la rabia, del cual se conocen sus componentes antigénicos, constituye un buen modelo para el desarrollo de vacunas de DNA.

El objetivo de este trabajo fue diseñar, haciendo uso de ingeniería genética, una recombinante portadora de la fusión del gen *N* y la región codificadora de los sitios antigénicos II y III del gen *G* del virus de la rabia.

Metodología. Debido a la frecuencia con que es aislada la cepa perro/mangosta VI del virus rábico en nuestro país, se eligió la cepa 118836 proveniente de un humano, previamente aislada y tipificada antigénicamente por Meléndez y col. (2001, datos no publicados). De la cepa seleccionada se extrajo el RNA viral y por RT-PCR se obtuvieron el cDNA del gen de la nucleoproteína (*N*) y el cDNA de la región codificadora de los sitios antigénicos II y III del gen de la glicoproteína (*G*) (el fragmento abarca de la base 67 a la 1029 del gen, $G_{67-1029}$). El gen *N* se clonó en el vector pcDNA3, el cual permitirá la expresión de la proteína en células eucariotas, y posteriormente se determinó su secuencia. Haciendo uso de los datos de esta, se decidió llevar a cabo la fusión con $G_{67-1029}$ en el sitio *EcoRI* hallado en *N*, ya que de esa manera se respetaba su marco de lectura además del marco de $G_{67-1029}$; además, como el sitio *EcoRI* se encuentra casi al final del extremo 3' de *N* no se esperaba la alteración de las propiedades antigénicas de la proteína de fusión.

Resultados y Discusión. Se decidió trabajar con el gen *N* ya que se ha visto que a pesar de que en el desarrollo de vacunas antirrábicas de DNA se ha trabajado principalmente *G* (2), también la ribonucleoproteína induce protección, estando dirigidos la mayoría de los linfocitos B y T contra *N*. Además, debido a que *N* presenta alto grado de homología entre las diferentes variedades del virus y virus asociados, se espera que una vacuna contra ella induzca una respuesta inmune de amplio espectro contra varias cepas (3). En cuanto a la glicoproteína se sabe que presenta varias regiones antigénicas

de las cuales los sitios II y III son de suma importancia: el sitio antigénico II ha sido descrito como potencial inductor de anticuerpos neutralizantes y de linfocitos T_H ; y el sitio antigénico III es el responsable del neurotropismo del virus (4), de manera que al realizar una fusión del gen *N* y la región 67-1029 del gen *G*, en la cual respetaran sus marcos de lectura y las regiones importantes para la antigenicidad de los productos codificados por ellos, se buscó obtener los beneficios de ambos componentes virales en el desarrollo de una construcción con capacidad inductora de una respuesta inmune protectora.

La secuencia del gen *N* se analizó por BLAST y CLUSTALX encontrándose alineamientos con genes de *N* de virus de la rabia reportados en el GeneBank, por lo cual se confirma su integridad y correcta clonación en el vector de expresión. También se determinó la secuencia de G_{67-962} clonado en pauta con el gen *N*, verificándose la clonación por digestión con *EcoRI* y la orientación correcta (5' 3') con los mismos datos de la secuencia y por PCR's empleando varias combinaciones de iniciadores dirigidos contra $G_{67-1029}$ y *N*, cuyos productos demostraron dicha orientación.

Conclusiones. Se diseñó y se obtuvo la construcción *N*-pcDNA3- $G_{67-1029}$, la cual será ensayada para determinar la expresión *in vitro* de la proteína de fusión y su potencia como vacuna de ácidos nucleicos en modelos animales.

Agradecimiento. Al INDRE por la facilitación de sus instalaciones para realizar la extracción del RNA viral. Proyecto apoyado por la CGPI del IPN con clave 990237. Jiménez Alberto, A. y Meléndez Félix, A. becarias del CONACYT. Ribas-Aparicio R.M. es becario de EDD-IPN; COFAA-IPN y miembro del SNI-CONACYT.

Bibliografía.

1. Velázquez, M. O.J.; Kuri, M. P. y Q. P., Cravioto. (1999). Epidemiología. Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 16(31): 14.
2. Wiktor, T. J.; Macfarlan, R. I.; Reagan, K. J.; Dietzschold, B.; Curtis, P. J.; Wunner, W. H.; Kieny, M. P.; Xiang, Z. Q.; Spitalnik, S. L.; Cheng, J.; Erikson, J.; Wojczyk, B. y H. C-J, Ertl. (1995). Immune responses to nucleic acid vaccines to rabies virus. *Virology*. 209: 569-579.
3. Fu, Z. F.; Dietzschold, B.; Schumacher, C. L.; Wunner, W. H.; Ertl, H. C. y H., Koprowski. (1991). Rabies virus nucleoprotein expressed in and purified from insect cells is efficacious as a vaccine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88(5): 2001-2005.
4. Benmansour, A.; Leblois, H.; Coulon, P.; Tuffereau, C.; Gaudin, Y.; Flamand, A. y F., Lafay. (1991). Antigenicity of rabies virus glycoprotein. *J. Virol.* 65(8): 4198-4203.