

Las vacunas génicas (ADN): ¿Pueden sustituir a las convencionales para el control de la rabia?

Álvaro Aguilar-Setién,* Emiliano Tesoro-Cruz,*^{***} Mónica Salas-Rojas,*
Rogelio Alonso-Morales,^{***} Francisco Blanco-Favela*

RESUMEN

Con el objeto de probar la viabilidad de una vacuna génica (ADN desnudo) contra la rabia se construyó el plásmido vacunal (pGQH) insertando el gen que codifica para la glicoproteína de rabia (aislado HQ01-IMSS), en el vector de expresión pCI-neo. El plásmido pGQH fue multiplicado en *E. coli* DH10B, purificado mediante cromatografía de intercambio aniónico. Ratones BALB/C adultos fueron vacunados por la vía intramuscular (IM) con 20 µg del plásmido pGQH y posteriormente desafiados (vía intracerebral, IC) con virus patógeno CVS (100LD50%) a los 90 días postvacunación. A partir del día 30 postvacunación, se observó una seroconversión superior a las 0.5 unidades internacionales (UI) en los ratones vacunados y éstos resistieron el desafío con virus CVS. Sin embargo, se encontró que el proceso de purificación del plásmido es laborioso y requiere de simplificación para que la vacuna génica sea competitiva. Se sugieren estrategias de simplificación.

Palabras clave: Vacuna génica de (ADN), rabia.

ABSTRACT

*To test the viability of a genic vaccine (naked DNA) against rabies, the vaccinal plasmid (pGQH) was constructed by inserting the gene that codifies for the rabies glycoprotein (isolate HQ01-IMSS), in the pCI-neo expression vector. The pGQH plasmid was multiplied in DH10B *E. coli*, purified by chromatography of anionic exchange. Balb/C adult mice were vaccinated intramuscularly (IM) with 20 µg pGQH, and 90 days post-vaccination, they were challenged (intracerebral route IC) with pathogen virus CVS (100LD50%). From day 30 on, seroconversion higher than 0.5 international units (IU) was observed in the vaccinated mice and they resisted the challenge with the CVS virus. However, it was found that the purification of the plasmid is difficult and requires to be simplified to make the genic vaccines easier to produce, and therefore market-competitive. Some simplification strategies are suggested.*

Key words: DNA vaccine, rabies.

INTRODUCCIÓN

Las vacunas génicas (ADN), representan una nueva modalidad que puede superar algunas de las principales inconveniencias de las vacunas tradicionales: seguridad, eficacia y bajo costo de producción. En lugar de incluir al agente infeccioso (atenuado o muerto) o proteínas del mismo, las vacunas génicas están constituidas por genes que codifican antígenos clonados

en plásmidos - pequeños anillos de ADN de doble cadena (producidos en gran escala por bacterias) - incapaces de producir infección, pero que al ser inoculados expresan antígenos en la célula huésped.¹⁻³

Las vacunas génicas pueden acarrear genes que codifican una o más proteínas antigénicas de uno o varios agentes patógenos y que son capaces de inducir inmunidad protectora; además, se pueden incluir genes que potencian la respuesta inmune.

* Unidad de Investigación Médica en Inmunología, Coordinación de Investigación, Instituto Mexicano del Seguro Social.

** Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán.

*** Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.

Correspondencia:

Dr. Álvaro Aguilar Setién

Coordinación de Investigación Médica, Av. Cuauhtémoc Núm. 330, Col. Doctores, 06725 México D.F. E-mail: varoaguila@prodigy.net.mx

Recibido: 16-07-2008

Aceptado: 04-12-2008

Los genes de los antígenos elegidos, son aquellos que estimulan eficientemente el sistema inmune y son expresados en su oportunidad por el huésped después de que el ADN penetra el núcleo de una célula del individuo vacunado. Los antígenos así producidos se presentan al sistema inmune de dos maneras: a) emergen de las células transfectadas y son detectados, procesados y presentados al sistema inmune, por macrófagos y otras células presentadoras de antígeno, acopladas a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (CMH) clase II; b) se fraccionan en el citoplasma y son presentados en la membrana celular, ahora con moléculas del CMH clase I. Así, una vacuna génica genera una respuesta inmune completa, en cuanto a inmunidad humoral y celular, que en ocasiones no se obtiene con las vacunas tradicionales, sobre todo con las vacunas de virus "muertos" o subunidades, que suelen carecer de una presentación de antígenos por moléculas del CMH clase I.⁴⁻⁷

Las ventajas principales que presentan las vacunas génicas sobre las vacunas tradicionales son: 1) durante su producción y su uso no se maneja al agente patógeno, lo que garantiza mayor inocuidad; 2) la producción es más simple y económica. Las vacunas tradicionales requieren de insumos caros y sofisticados para el cultivo *in vitro* de células animales, en tanto que las vacunas génicas sólo necesitan medios inertes para el cultivo de bacterias que fabrican masivamente los plásmidos. 3) Dado que la vacuna génica es ADN, éste es muy estable a temperatura ambiente, por lo que teóricamente no se requiere una estricta cadena fría para su manejo y distribución. Estas características hacen a las vacunas génicas, excelentes opciones de producción en países en vías de desarrollo.¹⁻³

La Organización Mundial de la Salud (OMS) informa que cada 15 minutos muere una persona en el mundo víctima de la rabia, lo que implica 35,000 muertes anuales debidas a esta enfermedad. En estos casos no solamente se considera al perro, incluye a otros animales, sin embargo, este animal sigue siendo el principal transmisor de la rabia a humanos. La mayoría de los casos se presentan en los países en vías de desarrollo de Asia, África y América Latina en donde en ocasiones no se pueden implementar las campañas de vacunación debido al alto costo de producción y/o de importación de las vacunas producidas de manera tradicional.⁸

En México, así como en otros países de la América Latina como Brasil, la rabia transmitida por el perro está siendo controlada por medio de la vacunación intensiva de dicha especie. En nuestro país se aplican

alrededor de 14,000,000 de dosis al año.⁹ Estas campañas son onerosas debido al alto costo de las vacunas tradicionales (aproximadamente 5 pesos por dosis, sin contar los gastos que implican las estrategias de su aplicación). En estos países, es necesario mantener el nivel de la vacunación del perro (al menos en forma temporal) a fin de que las tendencias de eliminación de los casos humanos no reviertan. La utilización de la vacuna génica en dichas campañas podría abaratar considerablemente el costo de las mismas, ya que para su producción, no se requieren de insumos caros para el cultivo de células animales *in vitro*. Un biológico barato y seguro, permitiría también que países, o regiones, que no han iniciado campañas de vacunación por el costo tan alto que representan las vacunas tradicionales, puedan iniciarlas.

En México no se ha ensayado esta tecnología, ni evaluado las posibilidades de su aplicación y por lo mismo no se ha detectado la problemática experimental e industrial asociada a este tipo de biológicos. En el presente artículo se discuten los primeros resultados de la construcción, antigenicidad y producción de una vacuna génica contra la rabia desarrollada en México; también se señalan algunos de los problemas que plantea su producción industrial.

MATERIAL Y MÉTODOS

Virus y células

En las pruebas de seroneutralización viral se utilizó la cepa PV (Pasteur Virus), donada por el Instituto Pasteur de París a nuestro laboratorio en 1992. Para las pruebas de desafío, se utilizó virus CVS (Challenge Virus Standard). Para la clonación del gen que codifica para la proteína G del virus de la rabia, se utilizó virus de rabia HQ01-IMSS aislado de un niño que murió de rabia transmitida por un quiróptero hematófago (vampiro común, *Desmodus rotundus*).¹⁰

Se usaron células BHK21 (riñón de hámster) y CHO (ovario de hámster) que fueron cultivadas en medio Glasgow (*In vitro*, México) y F12 HAM (*In vitro*, México) respectivamente, suplementados con suero fetal bovino (SFB) (10% durante la fase de multiplicación y 2% durante la fase estacionaria), antibióticos y antimicóticos. Las células BHK 21 se utilizaron para las pruebas de seroneutralización y para replicar el virus PV. Las células CHO se emplearon para los experimentos de transfección celular *in vitro*.¹¹ Para propagar los virus CVS y HQ01-IMSS se utilizaron ratones lactantes (4 -7 días) BALB/c de ambos sexos. (*vide infra*).

Construcción del plásmido vacunal

El plásmido vacunal (pGQH) fue construido tomando como base el procedimiento descrito por Bahloul y col. en 1998.¹² Por medio de transcripción reversa y amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR), a partir de ARN obtenido de cerebros de ratones infectados con el virus rábico de la cepa HQ01-IMSS, se amplificó un fragmento de 1,576 pb, que contiene la totalidad del gen que codifica para la glicoproteína G. Éste fue amplificado con iniciadores que tienen un sitio de reconocimiento para la endonucleasa de restricción XbaI (iniciador sentido: 5' TTC TAG AGS MAM SAT GGT TCC KCA RGC TCT 3'; iniciador reverso: 5' ATT CTA TCA CAG TCY RGT CTC ACC CCC 3'). Este fragmento fue en un principio clonado en el plásmido pUC19 en el sitio SmaI al cual se le había adicionado colas de timidina. Posteriormente a partir del ADN del plásmido el fragmento fue liberado por digestión con la endonucleasa XbaI. Este fragmento fue purificado a partir de un gel de agarosa al 1% y ligado al plásmido pCI-neo que previamente había sido digerido con la misma endonucleasa de restricción y desfosforilado. El plásmido pCI-neo (Promega Corporation, Madison, WI. EUA) es un vector comercial de expresión en células de mamífero que porta la región promotora del citomegalovirus humano, éste permite la expresión constitutiva de los genes clonados. El vector pCI-neo contiene también la señal de poliadenilación del virus SV40 y genes de resistencia a la neomicina en sistema de células eucariotes y a la ampicilina para células bacterianas.

Producción del plásmido vacunal

El plásmido vacunal fue propagado en la cepa bacteriana DH10B de *Escherichia coli*. Las bacterias se cultivaron en medio de Luria (triptona 1%, extracto de levadura 0.5% y NaCl 1%) adicionado con ampicilina (100 µg/mL) en volumen de 2.5 litros. Después de 24 horas de crecimiento, el plásmido vacunal fue purificado utilizando el sistema comercial *Endofree Plasmid Giga Kit* (Quiagen®) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente la bacteria se cosecha por centrifugación. Ésta se lisa alcalinamente y el ADN cromosomal es eliminado por filtración. El extracto bacteriano es tratado para la eliminación de endotoxinas. Finalmente, el ADN plasmídico es purificado en columnas de intercambio iónico (DEAE-silica).

En este trabajo se evaluó la capacidad de retención del ADN plasmídico en las columnas con DEAE-silica

en comparación a la resina Q Sepharosa XL® (Pharmacia). Para esto se hizo pasar diferentes cantidades de ADN (50, 100, 150 y 200 µg) por 1 mL (DEAE-silica) y 0.2 mL (Q Sepharosa XL) de volumen de la resina y se evaluó por electroforesis en geles de agarosa al 1% en qué punto el ADN no era retenido. Así mismo se cuantificó el ADN plásmido retenido en la columna.

Tansfección *in vitro* de células CHO con el plásmido vacunal

La capacidad del plásmido vacunal (pGQH) para inducir la expresión de la proteína G del virus de la rabia, fue comprobada mediante transfección de células CHO *in vitro*, por el método calcio/fosfato, utilizando un juego comercial (Sigma CA-PHOS) siguiendo las instrucciones del fabricante. En botellas de poliestireno, de 9 cm² de superficie, con fondo deslizable, (*slide flask*) (*In vitro*) se sembraron células CHO a una concentración de 2×10^5 células/mL, en medio F12 HAM (*In vitro*) suplementado con SFB (*In vitro*). Después de 20-24 horas de incubación a 37 °C (80% de confluencia celular), el medio de cultivo se desechó y se realizó la transfección con 5 µL del plásmido vacunal a una concentración de 1 µg/mL, adicionado con 6 µL de CaCl₂ (0.125 M) (Sigma) durante 16 horas. Posteriormente, el medio de transfección fue retirado y se cambió por medio F12 HAM suplementado con 10% de SFB. Después de 48 horas de incubación a 37°C, la expresión de la proteína G del virus de la rabia, en las células CHO transfectadas, se reveló mediante la utilización de un anticuerpo policlonal conjugado a la fluoresceína, obtenido en un conejo hiperinmunizado con vacuna contra la rabia de uso humano Verorab®. Una vez teñidas con el anticuerpo fluorescente, las células fueron observadas en un microscopio confocal Carl Zeiss LSM 510®.

Inmunización de ratones

El plásmido vacunal obtenido fue inoculado en el músculo tibial de 10 ratones BALB/C hembras (6-8 semanas de edad) a razón de 20 µg de plásmido (en 50 µL de PBS) por animal. Se utilizaron como control 10 ratones de las mismas características, a los cuales se les inyectó únicamente 50 µL de PBS. Los animales (vacunados y controles) fueron sangrados antes y después (días 30, 45 y 60) de la inoculación del plásmido, para la detección de anticuerpos antirrábicos.

Pruebas serológicas

La detección de anticuerpos contra la glicoproteína (proteína G) del virus de la rabia en los ratones inmunizados se realizó por medio de las pruebas de seroneutralización e inmunotransferencia (Western blot). Las pruebas de seroneutralización se llevaron a cabo por medio de la técnica rápida de reducción de focos fluorescentes siguiendo el procedimiento descrito.^{16,17} Los títulos virus-neutralizante obtenidos para cada suero se expresaron en unidades internacionales (UI), utilizando como referencia un suero estándar con título establecido de 5 UI. Las pruebas de *Western blot* se hicieron utilizando virus de rabia cepa PV purificado en gradiente de sacarosa,¹⁸ el cual se

sometió a electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones reductoras (SDS/PAGE). Posteriormente los polipéptidos separados del virus se transfirieron a papel de nitrocelulosa, el cual fue bloqueado con una solución al 5% de albúmina sérica bovina. Después de lavado, el papel de nitrocelulosa se incubó con una dilución 1:40 de cada uno de los sueros de los ratones inmunizados. La detección de anticuerpos contra la glicoproteína de rabia se reveló utilizando un conjugado peroxidasa anti-Ig G de ratón y diaminobencidina como cromógeno.¹⁸

Desafío

Con el objeto de probar la capacidad de la vacuna génica para conferir protección contra la rabia (antigenicidad), los ratones vacunados y controles fueron desafiados con una inyección intracerebral de 100 DL50 de virus CVS, 75 días después de la vacunación.¹²

RESULTADOS

Producción de la vacuna génica

La cantidad de masa bacteriana (biomasa) obtenida en promedio a partir de 2.5 litros de medio de cultivo fue de 8.1 ± 4 g. La cantidad de ADN plasmídico puro, obtenido de esta biomasa fue de 0.8 a 4.5 mg con un promedio de 3.5 mg, considerando 10 ciclos de purificación. En la *figura 1* se muestra la electroforesis en gel de agarosa (1%) de las muestras obtenidas en los diferentes pasos de la purificación del plásmido utilizando el equipo comercial Qiagen® (filtración para eliminación de ADN cromosomal, lavado y elución). La capacidad de retención de las columnas utilizadas (Qiagen y Q Sepharosa XL con base en 1 y 0.2 mL de resina respectivamente) para la purificación del plásmido vacunal se presenta en la *figura 2*. Puede observarse que en ningún caso se rebasa la capacidad de 150 µg de retención. Con base en los resultados de producción, obtenidos en el laboratorio, se elaboró el *cuadro 1* en el que se exponen los diferentes volúmenes que se usarían en la fabricación de la vacuna a escala industrial (volúmenes de 2.5, 10, 20 y 100 litros).

Funcionalidad de la vacuna génica

En las células CHO que fueron transfectadas con el plásmido vacunal, se detectó la expresión de la proteína G del virus de la rabia utilizando un anticuerpo de conejo hiperinmunizado contra el virus de la rabia, conjugado a la fluoresceína (*Figura 3*).

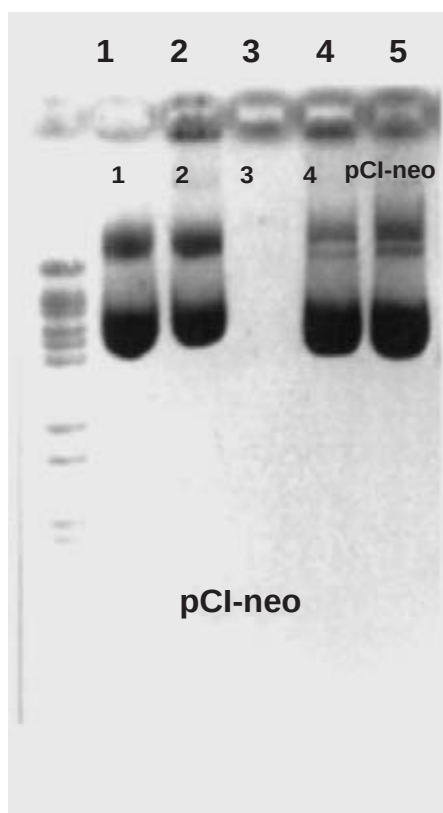


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa en donde se monitorean los pasos de la purificación del plásmido. En el carril 1 se muestra lisado bacteriano crudo y libre de ADN cromosomal antes del paso por la columna. En el carril 2 se muestra el filtrado de lisado por la columna de intercambio iónico. En el carril 3 se muestra el lavado de la columna. En el carril 4 se muestra la elución del plásmido de la columna y en el carril 5 el plásmido después de haber sido precipitado y suspendido. pCl-neo = vector de expresión.

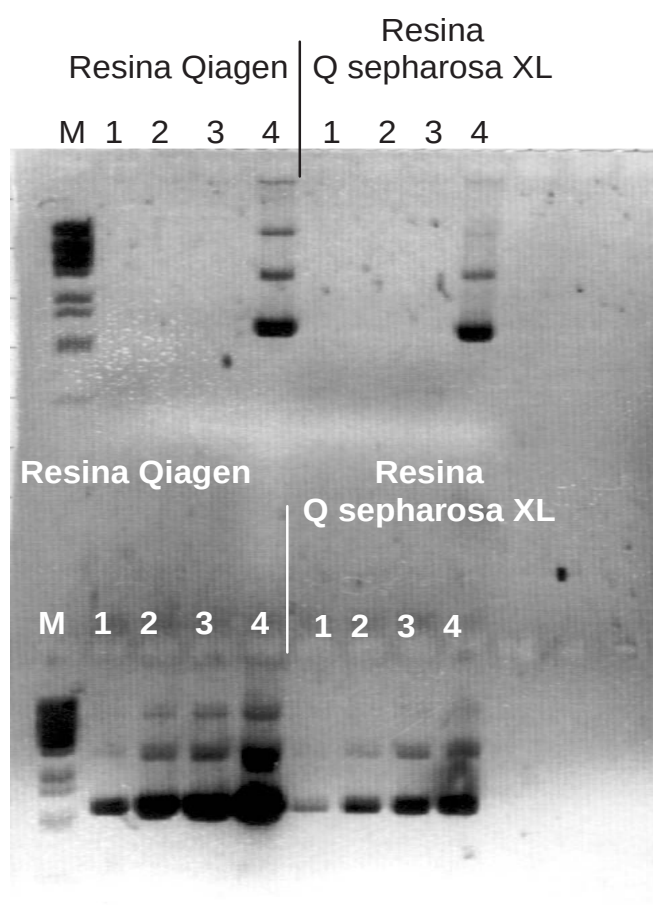


Figura 2. Electroforesis en agarosa al 1% en los carriles 1 al 4 de la parte superior del gel, los filtrados por las columnas de las diferentes cantidades de ADN (50, 100, 150 y 200 µg, respectivamente). En los carriles de abajo se observan las eluciones del ADN plásmido de las columnas respectivas.

La *figura 4* señala los resultados de la seroconversión de los ratones inmunizados con la vacuna génica. Se puede observar que, a partir de los 30 días, se rebasa en promedio 0.5 UI (requisito mínimo de la OMS para ser considerada una inmunización exitosa) y a los 60 días se rebasa 1.0 UI. Todos los sueros de los ratones inmunizados con la vacuna génica tomados a los 60 días después de la vacunación, reconocieron la glicoproteína del virus de la rabia en las pruebas de Western blot (*Figura 5*), mientras que sólo dos fueron positivos de los colectados al día 30 y ninguno de los obtenidos al día 15 lo hicieron.

El 100% de los ratones vacunados con la vacuna génica sobrevivieron al desafío, (inyección intracerebral de 100 DL50 de virus CVS); mientras que todos los ratones controles, no vacunados, enfermaron de rabia y sucumbieron ante dicho reto.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos nos muestran que la construcción y producción de una vacuna génica es posible en nuestro medio y, al igual que otros reportes,^{12-14,19} se demuestra que la vacunación génica es eficaz (*Figuras 4 y 5*). Sin embargo, se encontró que el proceso de purificación del plásmido es particularmente crítico en la producción de la vacuna. Se evaluó un sistema de purificación de ADN de plásmidos comercial (Qiagen®). Este sistema es el más usado en trabajos previos, ya que proporciona un protocolo sencillo y todos los reactivos necesarios para la obtención de ADN libre de endotoxinas. Consiste en protocolos previamente existentes en el dominio público, que se basan en la lisis alcalina de la masa bacteriana

Cuadro I. Volúmenes hipotéticos a manejar en la producción industrial del plásmido vacunal (pGQH).

Pasos	Etapas	Volumen de fermentación			
		2.5 L	10 L	20 L	100 L
Crecimiento bacteriano	Biomasa	8.1 gm	32.4 gm	64.8 gm	3,240 gm
	Suspensión celular	100 mL	400 mL	800 mL	4,000 mL
	Lisis	100 mL	400 mL	800 mL	4,000 mL
	Neutralización	100 mL	400 mL	800 mL	4,000 mL
	Volumen total a manejar	300 mL	1,200 mL	2,400 mL	12,000 mL
Eliminación del ADN cromosomal	Diámetro del filtro	8.5 cm	34 cm	72 cm	340 cm ó 5X 72 cm
	Centrifugación en botellas de 500 mL	1 botella	4 botellas	8 botellas	40 botellas
	Volumen de columna	20 mL	80 mL	160 mL	800 mL
	Lavado	200 mL	800 mL	1,600 mL	8,000 mL
Purificación plásmido	Eluido	35 mL	140 mL	280 mL	1,400 mL
	Rendimiento 1.4 mg/L	3.5 mg	14.3 mg	14.3 mg	143 mg

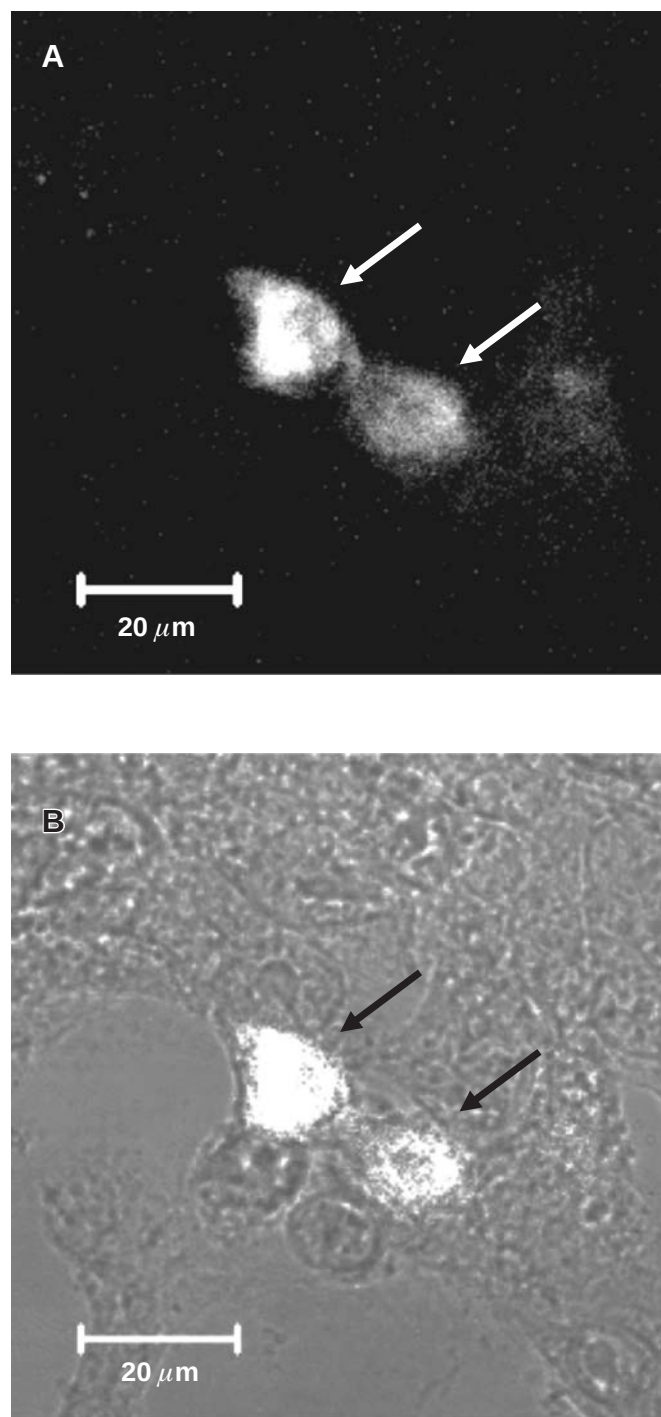


Figura 3. Inmunofluorescencia de la proteína G del virus de la rabia, producida por células CHO, 48 horas después de la transfección con el plásmido vacunal (pGQH). **A:** Imagen confocal de la fluorescencia. **B:** Óptica de Nomarski de la misma imagen en donde se pueden ver las células. Las flechas indican las células positivas.

(biomasa) y centrifugación, o filtración para la remoción del ADN cromosomal. El sistema proporciona un compuesto que elimina las endotoxinas y emplea una columna con una resina de intercambio aniónico (DEAE acoplado a partículas de sílica) para concentrar y purificar el ADN del plásmido. En la columna se lavan todos los contaminantes y el ADN del plásmido se eluye al aumentar la fuerza iónica.

En algunas preparaciones en donde se pudieron obtener buenos niveles de amplificación del ADN plasmídico (4.5 mg) se observó que la resina del equipo de Qiagen® fue incapaz de retener todo el plásmido producido. Debido a lo anterior, se efectuaron experimentos para evaluar la capacidad de retención de ADN plasmídico de la resina de intercambio iónico del estuche de Qiagen®, así como de la resina Q sepharosa XL. Para esto se pasaron diferentes cantidades de ADN (50, 100, 150 y 200 µg) por la resina de Qiagen® y por la resina Q sepharosa XL. En ambos casos 150 µg fueron retenidos en su totalidad, mientras que 200 µg desbordaron la capacidad de las dos resinas (Figura 2). Sin embargo, podemos afirmar que la resina Q sepharosa XL es más adecuada para una producción industrial, ya que tiene una mayor capacidad, pues se utilizó en menor volumen (0.2 mL) que el de la resina Qiagen® (1 mL). El cuadro I nos muestra los volúmenes que se tendrían que manejar extrapolando los resultados obtenidos en el laboratorio a una producción industrial (10, 20 y 100 litros). Las dificultades notables son: la cantidad de botellas de 500 mL a centrifugar (40 en el fermentador de 100 litros), y el diámetro de los filtros a utilizar en la etapa de eliminación del ADN cromosomal (340 cm en el fermentador de 100 litros). Estos filtros no existen en el mercado y habría que construirlos. Por otro lado, la cantidad de plásmido vacunal puro obtenido en el fermentador de 100 litros sería de tan sólo 143 mg. En un trabajo previo se reporta 100 µg de plásmido como una dosis eficaz para proteger al perro contra la rabia;¹³ esto quiere decir que el fermentador de 100 litros produciría en un proceso de fermentación (“corrida”) 1,430 dosis de vacuna, lo que por otro lado significa un manejo impráctico de más de 200 corridas para 300,000 dosis. Sin embargo, se ha observado que se pueden utilizar dosis menores a los 100 µg (dosis escogida en forma arbitraria) como vacuna si se utilizan adyuvantes²¹⁻²³ o si la vacuna se administra por vía subcutánea en la punta de la oreja, la cual resulta superior a la aplicación intramuscular.²⁴

En resumen, podemos mencionar dos puntos críticos en la producción industrial de una vacuna génica: 1) las etapas de purificación del plásmido (ar-

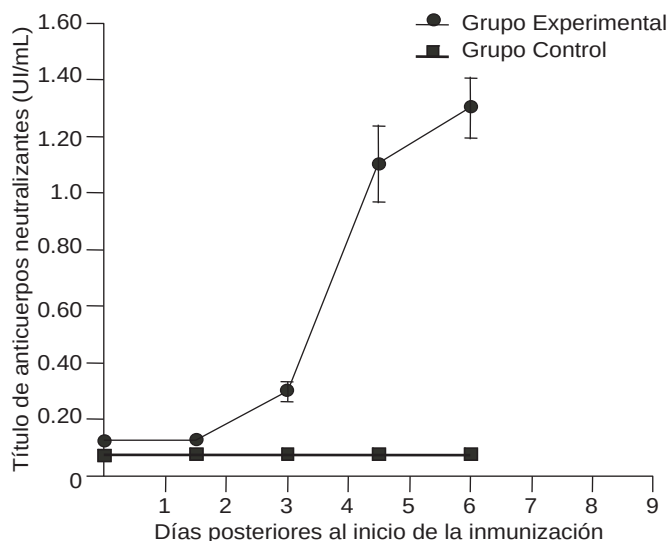


Figura 4. Inducción de anticuerpos virus-neutralizantes hacia el virus de la rabia (cepa PV) en ratones inmunizados con el plásmido vacunal (pGQH). Títulos expresados en unidades internacionales (UI).

duas); 2) la gran cantidad de plásmido puro necesario por dosis. Las estrategias para solucionar estos problemas pueden ser de diversa índole. En primer lugar podría reducirse la dosis a utilizar mediante el uso de adyuvantes que aumenten la eficacia de la transfección, o que incrementen la respuesta inmune.²¹⁻²³ La vía de administración podría también influir en la cantidad de plásmido.²⁴ La reducción de la dosis de plásmido vacunal volvería al sistema más ágil y práctico al reducir el número de “corridas” de fermentación y de procesos de purificación. En segundo lugar podría eliminarse por completo la etapa de purificación del plásmido, utilizando a la bacteria directamente como vector de transfección. Esta segunda posibilidad eliminaría lo más arduo del proceso de producción, que es la etapa de purificación y sólo conservaría la parte más simple y barata del proceso que es la multiplicación de la masa bacteriana.²⁵ Hay que considerar también que la composición del medio de cultivo y las condiciones de fermentación tienen una fuerte influencia en los niveles de plásmido que se obtienen de la biomasa.²⁶ El manejo de uno o varios de los factores mencionados previamente podría llevarnos a superar algunos de los puntos críticos de producción industrial de la vacuna génica, colocándola en posibilidad de competir con las tradicionales.

En estudios previos hechos con diferentes vacunas génicas antirrábicas, en diferentes especies (ratones,

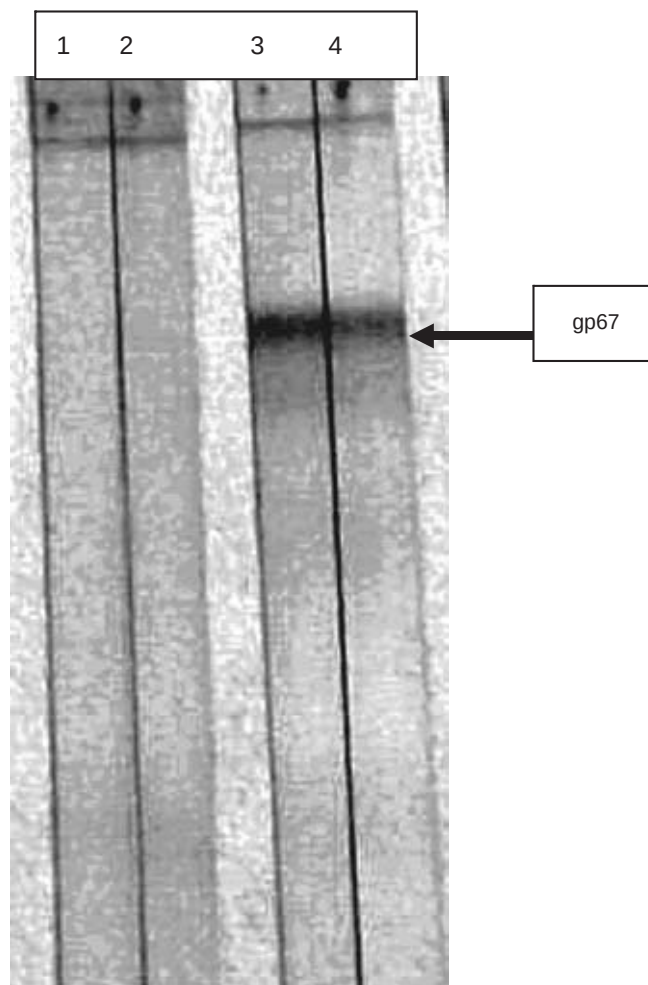


Figura 5. “Western blot”, efectuado con sueros de ratones inmunizados con el plásmido vacunal (pGQH), tomados a los 60 días posteriores a la inmunización (3,4). Control negativo (1,2). Proteína G (gp 67).

perros y primates no-humanos),^{12-14,27} se utilizaron plásmidos que codifican para la glicoproteína (proteína G) del virus de la rabia procedente de animales terrestres (rabia de ciclo terrestre, cepas CVS, ERA y PV). En este trabajo se utilizó un plásmido que codifica para la proteína G de un aislado procedente de murciélago hematófago *D. rotundus* (aislado HQ01-IMSS). Si bien se ha demostrado que las diferentes vacunas protegen bien contra virus patógenos, sin importar la procedencia de uno o la otra,¹² se recomienda utilizar virus homólogo en los brotes de rabia. Por esta razón, el construido mexicano se hizo considerando las tendencias actuales en el país de disminución de la rabia del perro (ciclo terrestre) y aumento en importancia

de la rabia del murciélago hematófago (ciclo aéreo) que provoca alrededor de 10,000 muertes por rabia parálítica bovina en el ganado.

REFERENCIAS

1. Tang DC, De Vit MJ, Johnston SA. Genetic immunization: a simple method for eliciting an immune response. *Nature*. 1992; 259: 1745-9.
2. Fynan EF, Webster RG, Fuller DH, Haynes JR, Santoro JC, Robinson HL. DNA vaccines: Protective immunizations by parenteral, mucosal, and gene-gun inoculations. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90: 11478-82.
3. Donnelly JJ, Ulmer JB, Shiver JW, Liu MA. DNA vaccines. *Ann Rev Immunol*. 1997; 15: 617-48.
4. Pardoll DM, Beckerleg AM. Exposing the immunology of naked DNA. *Immunity*. 1995; 3: 165-9.
5. Feltquate DM, Heaney S, Webster RG, Robinson HL. Different T helper cell types and antibody isotypes generated by saline and gene gun DNA immunization. *J Immunol*. 1997; 158: 2278-84.
6. Manickan E, Kanangat S, Rouse RJD, Yu Z, Rouse BT. Enhancement of immune response to naked DNA vaccine by immunization with transfected dendritic cells. *J Leukocyte Biol*. 1997; 61: 25-132.
7. Kowalczyk DW, Ertl HC. Immune responses to DNA vaccines. *Cell Mol Life Sci*. 1999; 55: 751-70.
8. Pastoret PP, Brochier B, Aguilar Setién A, Blancou J. *Vaccination against rabies*. In: Pastoret PP, Blancou J, Vannier P, Verschuere C. [eds.], *Veterinary vaccinology*. Amsterdam: Elsevier; 1997. p. 616.
9. Secretaría de Salud. Sistema único de Información para la Vigilancia Epidemiológica, Secretaría de Salud. Disponible en: <http://www.epi.org.mx>
10. Aguilar-Setién A, Aguila-Tecuatl H, Tesoro-Cruz E, Ramos-Ramirez L, Kretschmer RS. Preservation of rabies RNA in brain tissue using glycerine. *T Royal Soc Trop Med Hyg*. 2003; 97: 547-9.
11. Chaney WG, Howard DR, Pollard JW, Sallustio S, Stanley P. High-frequency transfection of CHO cells using polybrene. *Somatic Cell Molec Genet*. 1986; 12: 237-44.
12. Bahloul C, Jacob Y, Tordo N, Perrin P. DNA-based immunization for exploring the enlargement of immunological cross-reactivity against the lyssaviruses. *Vaccine*. 1998; 16: 417-25.
13. Perrin P, Jacob Y, Aguilar-Setién A, Loza-Rubio E, Jallet C, Desmézières E, et al. Immunization of dogs with a DNA vaccine induces protection against rabies virus. *Vaccine*. 1999; 18: 479-86.
14. Perrin P, Jacob Y, Tordo N. DNA based-immunization against Lyssaviruses. *Intervirology*. 2000; 43: 302-11.
15. Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al. *Short protocols in molecular biology*, 4th ed. New York; John Wiley & Sons Inc.: 1999. p. 27-9.
16. Bourhy H, Sureau P. *Laboratory methods for rabies diagnosis*. Institut Pasteur; 1999. p. 197.
17. Smith JS, Yager PA, Baer GA. A rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) for determining rabies neutralizing antibodies. In: Meslin IX, Kaplan MM, Koprowski H. [eds.]. *Laboratory techniques in rabies*. 4th ed. Geneva; World Health Organization; 1996. p. 181-92.
18. Harlow E, Lane D. Immunoblotting, In: *Antibodies: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1988. p. 471-510.
19. Xiang Z, Spitalnik S, Tran M, Wunner W, Cheng J, Hertl H. Vaccination with a plasmid vector carrying the rabies virus glycoprotein induces protective immunity against rabies virus. *Virology*. 1994; 199: 132-40.
20. Rosado-Vallado M, Mut-Martin M, Garcia-Miss M del R, Dumonteil E. Aluminum phosphate potentiates the efficacy of DNA vaccines against *Leishmania mexicana*. *Vaccine*. 2005; 23: 5372-9.
21. Mimper RJ, Duguid JG, Anwer K, Barron MK, Nitta H, Rolland AP. Polyvinyl derivatives as novel interactive polymers for controlled gene delivery to muscle. *Pharm Res*. 1996; 13: 701-9.
22. Martin-Orozco E, Kobayashi H, Van uden J, Nguyen M-D, Kornbluth RS, Raz E. Enhancement of antigen-presenting cell surface molecules involved in cognate interactions by immunostimulatory DNA sequences. *Int Immunol*. 1999; 11: 111-8.
23. Krieg AM. CpG DNA: a novel immunomodulator. *Trends Microbiol*. 1999; 7: 64-75.
24. Tesoro-Cruz E, Calderón-Rodríguez R, Hernández-González R, Blanco Favéla F, Aguilar Setién A. Intradermal DNA vaccination in ear pinnae is an efficient route to protect cats against rabies virus. *Vet Res*. 2008; 39: 16-26
25. Schödel F. *Attenuated Salmonella as a live vector for expression of foreign antigens*. Part II: Carrying viral antigens. In: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS [eds.]. *New generation vaccines*. 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc.; 1997. p. 343-9.
26. Schmidt T, Friehs K, Flaschel E. Rapid determination of plasmid copy number. *J Biotech*. 1996; 49: 219-229.
27. Lodmell D, Ray N, Parnell M, Ewalt R, Hanlon D, Shaddock J, et al. DNA immunization protects non-human primates against rabies virus. *Nature Med*. 1998; 4: 949-952.