

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Detección Molecular del Virus de la Fiebre Aftosa en Muestras de
Ganado Infectado y Utilización del Sistema Bac to Bac para la
Construcción de Baculovirus Recombinantes con Genes Immunogénicos**

DANIEL ALFREDO PALACIOS ORELLANA

Paulina Andrade, MSc, Directora de Tesis

Tesis presentada como requisito para la obtención del título de Ingeniería en
Procesos Biotecnológicos

Quito, Junio 2013

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE APROBACION DE TESIS

Detección Molecular del Virus de la Fiebre Aftosa en Muestras de Ganado Infectado

y utilización del Sistema Bac to Bac para la Construcción de Baculovirus

Recombinantes con Genes Inmunogénicos.

Daniel Palacios Orellana.

Paulina Andrade MSc.

Director de la tesis y

Miembro de Comité de Tesis

Venancio Arahana, Ph.D.

Miembro del Comité de Tesis

Maria de Lourdes Torres, Ph.D

Miembro del Comité de Tesis

Stella de la Torre, Ph.D.

Decano del Colegio de Ciencias

Biologicas y Ambientales

Quito, junio del 2013

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art.144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

Daniel Palacios Orellana

CI: 0919664797

Quito, junio 2013.

Dedicatoria

Dedico esta tesis a mi familia. A mis padres Susana y Roberto por su amor incondicional, su apoyo y sus consejos a lo largo de mi carrera. A mis hermanos Adrián y Tito y a mi abuelita Rosita por siempre haber estado conmigo.

Agradecimientos

Agradezco primeramente a mi familia, han sido un apoyo enorme para mí y en verdad siento que sin su ayuda no hubiera logrado llegar hasta donde estoy ahora, son lo más importante en mi vida y deben ser los primeros a quienes agradezca en este trabajo. Agradezco de igual manera a mis queridos amigos quiteños (regionalistas) Juan Jo, Vivi, Bernardo (Venado), Cris, Dianita, Darío, José, Marisa, Cami, Majo, Ale Celi, Marieli, Ale Valdés, Chepo, Rommel, Edu, Pedro. Sea como sea, los considero como mi familia, teniéndolos a ustedes a mi lado nunca me sentí solo a pesar de vivir lejos de mi familia, no hay palabras que describan lo agradecido que estoy con cada uno de ustedes. Agradezco también a cada uno de mis profesores por todas las enseñanzas no sólo académicas sino de vida, han sido una gran inspiración para mí. A mis amigos de toda la vida: Hugo, Ricky, Erick, José María, Miguel. Siempre estuvieron conmigo así sea a la distancia, les agradezco de todo corazón.

Resumen

El virus de la fiebre aftosa pertenece a la familia de los Picornavirus y es un virus que afecta mayormente a animales bovinos, ovinos, porcinos y caprinos. Se divide en 7 serotipos: O, A, C, Sat1, Sat2, Sat3 y Asia1. En Latinoamérica, los serotipos más prevalentes son el O y A, en Ecuador, el serotipo de mayor incidencia es el O. La vacuna que se utiliza actualmente es una vacuna convencional de virus inactivado que posee algunas desventajas como una respuesta inmune limitada, la necesidad de una cadena de frío para mantener a la vacuna viable y el requerimiento de grandes cantidades de virus para fabricarla. Una alternativa para sobrepasar estos problemas y en general los problemas de las vacunas convencionales, es la creación de subunidades de vacunas por medio de un sistema de expresión de proteínas recombinantes, donde se utiliza sólo las proteínas inmunogénicas del patógeno. Por lo tanto, este proyecto se centró en la aplicación del sistema Bac-to-Bac para la construcción de baculovirus recombinantes con genes de la cápside, altamente inmunogénicos, del virus de la fiebre aftosa como son VP1, P1-2A y 3C del serotipo O. Se logró obtener baculovirus recombinantes con el constructo VP1 y éstos, posteriormente, serán transfectados en células de insectos para la expresión y análisis de VP1 como un posible candidato de subunidad de vacuna.

Abstract

The Foot and Mouth disease virus belongs to the Picornavirus family and primarily affects to bovine, ovine, porcine and caprine. The virus is divided in seven serotypes, O, A, C, Sat1, Sat2, Sat3 and Asia1. In Latin America, the most prevalent serotypes are O and A, in Ecuador, serotype O is the most common. Currently, the vaccine in use is that of an inactivated virus that has some disadvantages such as a limited immune response, the need for a cold chain to keep the vaccine functional and the need of a great quantity of virus to manufacture it. An alternative to overcome these inactivated vaccine's problems is the creation of subunit vaccines using a recombinant protein expression system, where only the immunogenic components of the pathogen are used. Therefore, this project's main objective is the application of a Bac-to-Bac system for the construction of recombinant baculovirus with the foot and mouth disease virus' highly immunogenic capsid genes such as VP1, P1-2A and 3C from serotype O. Recombinant baculoviruses were obtained with the VP1 construct and these will be later transfected in insect cells for the expression and analysis of VP1 as a possible candidate for a subunit vaccine.

Tabla de contenidos

1.	Introducción	16
1.1	Clasificación y estructura del virus de la Fiebre Aftosa.	16
1.2	Epidemiología de la Fiebre Aftosa.....	18
1.3	Características de la enfermedad de la Fiebre Aftosa	18
1.4	Impacto Económico de la enfermedad de la Fiebre Aftosa	19
1.5	Vacunas	20
1.6	Descripción de los Baculovirus.....	22
1.7	Baculovirus como sistema de expresión de proteínas	23
1.8	Sistema Bac-to-Bac	24
2.	Justificación	27
3.	Objetivo General.....	28
4.	Objetivos Específicos	28
5.	Área de Estudio.....	29
6.	Materiales.....	29
6.1	Extracción de ARN	29
6.2	Retrotranscripción y Reacción en cadena de la polimerasa	29
6.3	Purificación de gel y PCR.....	30
6.4	Extracción de plásmido	30
6.5	Restricción enzimática	31
6.6	Ligación.....	32
6.7	Transformación Bacteriana	32
6.8	Transposición	32
6.9	Extracción de Bacmid	33

7.	Métodos	34
7.1	Detección molecular del virus de la Fiebre Aftosa.	34
7.1.1	Obtención de muestras de epitelio de lengua de ganado vacuno infectado... ..	34
7.1.2	Extracción de ARN total.....	34
7.1.3	Primers utilizados para detección molecular del virus de FA	35
7.1.4	Amplificación del ARN del virus	35
7.2	Creación de constructos	36
7.2.1	Diseño de primers para amplificar genes estructurales del virus de la FA	36
7.2.2	Amplificación de los genes estructurales.....	37
7.2.3	Purificación de los genes estructurales amplificados	38
7.2.4	Extracción del plásmido pFastBac.....	39
7.2.5	Restricción Enzimática de los genes estructurales y del vector.....	39
6.2.7	Purificación de los productos de la restricción enzimática.....	40
7.2.6	Ligación	41
7.2.7	Transformación Bacteriana.....	41
7.2.8	Sistema Bac to Bac	43
7.2.9	Extracción de Bacmid.....	44
8.	Resultados	45
8.1	Identificación molecular del virus de la Fiebre Aftosa	45
8.1.1	Extracción de ARN total.....	45
8.1.2	Amplificación de ARN del virus	45
8.2	Creación de constructos	45
8.2.1	Amplificación de genes estructurales	45
8.2.2	Extracción del plásmido pFastBac.....	46

8.2.3	Restricción enzimática, purificación y ligación de constructos.....	46
8.2.4	Transformación bacteriana con los constructos.....	47
8.2.5	Creación de baculovirus recombinantes con el Sistema Bac-to-Bac.....	47
8.	Discusión	48
9.	Conclusiones	52
10.	Recomendaciones	53
11.	Bibliografía	54
12.	Tablas.....	58
13.	Figuras	60
14.	Anexos	70

Índice de tablas, figuras y anexos

12. Tablas

Tabla 1: Lista de muestras de epitelio de lengua utilizadas para la detección molecular del virus de la FA donadas por el INH del Ecuador.	58
Tabla 2: Primers utilizados para la identificación. Las secuencias fueron obtenidas del Manual de Fiebre Aftosa: Instrumentos moleculares para caracterización viral del 2003 elaborado por Malirat y Bergmann	58
Tabla 3: Primers para la amplificación de los genes de la cápside.	59

13. Figuras

Figura 1: Esquema del genoma del virus de la FA. En esta figura se puede observar el genoma del virus de la Fiebre Aftosa junto con los genes P1 que darán como resultado la cápside del virus (Xu, 2010). Donde P1 contiene los genes estructurales del virus y P2 y P3 contienen los genes no estructurales (Strauss y Strauss, 2002) 60

Figura 2: Ciclo de infección de los Baculovirus. (A) Los virus en su forma ocluida son comidos por el insecto y sus cuerpos de oclusión son disueltos en el intestino medio. Los virus derivados de la oclusión son liberados e infectan las células epiteliales. (B) Los viriones salen de la célula en forma de virus brotados e inician la infección sistémica. (C) En la infección tardía se producen los viriones ocluidos, la célula muere liberando los cuerpos de oclusión. (D) El virus ocluido es liberado al ambiente (Rohrmann, 2008). 60

Figura 3: Esquema del vector pFastBac usado para este estudio. Contiene un sitio de clonación múltiple, gen de resistencia a la ampicilina y a la gentamicina, el promotor de la

proteína polihedrina (P_{ph}) y sitios Tn7R y Tn7L para la transposición en el Bacmid. (Invitrogen, 2010).	61
Figura 4: Esquema de la transposición del plásmido donador (pFastBac) al Bacmid. Se puede observar cómo la región mini Tn7 del pFastBac (flanqueado por Tn7R y Tn7L) entra a la región mini <i>att</i> Tn7 interrumpiendo el gen LacZ con la ayuda del Helper Plasmid (Vlak et al., 1999).	62
Figura 5: Esquema de constructos que se utilizaron en este proyecto. VP1, P1-2A y P1-2A-3C.....	63
Figura 6: Amplificación del serotipo O de Fiebre Aftosa de muestras de epitelio de ganado vacuno. L: escalera marca Axygen de 100 pb. (1) amplificación de la muestra 226 (2) Amplificación de la muestra 86.	63
Figura 7: Amplificación de los genes de la cápside de la FA. L 1kb) Escalera de 1kb marca promega. 1) Amplificación para el gen VP1 del virus de la FA. 2) Amplificación para el gen 3C del virus de la FA.	64
Figura 8: Amplificación del gen de la cápside de la FA. L100pb) escalera de axygen de 100 pb hasta 3000 pb. 1) Amplificación del conjunto de genes P1-2A.....	64
Figura 9: Extracción de plásmido pFastBac. L 250pb) Escalera marca axygen de 250 pb hasta 8000 pb. (1) Plásmido pFastBac a la altura de 4775 pb.	65
Figura 10: Plásmido linearizado con enzimas de restricción. L 250pb) Escalera marca axygen de 250 pb 1) Plásmido linearizado después de haber sido cortado con enzimas de restricción.....	66

- Figura 11:** Restricción enzimática del gen VP1 y del conjunto de genes P1-2A. L 250pb) Escalera de 250 pb a 8000 pb de axygen. 1) Restricción enzimática del gen VP1. 2) Restricción enzimática del conjunto de genes P1-2A donde se observa que el gen fue cortado en la mitad..... 66
- Figura 12:** Restricción enzimática del plásmido pFastBac con BamHI y HinDIII para determinar la presencia del gen VP1 dentro del vector. L 250pb) Escalera marca axygen de 250 pb. 1 – 7 restricciones enzimáticas a partir de plásmidos extraídos de colonias que crecieron después de la transformación bacteriana con VP1. 1, 2, 4, 5 y 7 resultaron ser positivas para el gen VP1..... 67
- Figura 13:** Figura comparativa de pFastBac-VP1 y pFastBac sin inserto. L 250 pb) Ladder marca axygen de 250 pb. 1) extracción de plásmido pFastBac-VP1. 2) Extracción de plásmido pFastBac sin inserto. 67
- Figura 14:** Crecimiento de colonias después de la transposición. Medio LB sólido suplementado con tetraciclina, gentamicina, kanamicina, X-GAL e IPTG en donde se observan varias colonias Lac negativas. De estas colonias se escogieron 5 al azar para realizar un screening con PCR y determinar cuáles poseían un Bacmid recombinante con el gen VP1..... 68
- Figura 15:** Extracción de Bacmid y PCR del Bacmid para comprobar la presencia del gen VP1. L 250 pb) Ladder marca Axygen de 250 pb – 8000 pb. 1-5) extracciones de Bacmid donde se puede observar la banda en la parte superior al gel correspondiente a 136 Kb. 6-10) PCR del Bacmid para determinar la presencia del gen VP1, se puede observar la

banda correspondiente al gen VP1 de 642 pb. C-) Control negativo del PCR en donde se utilizó agua de PCR en lugar de ADN en el mix de reacción..... 69

14. Anexos

Anexo 1: Fórmula utilizada para calcular la cantidad de inserto que se utilizó en la ligación.
..... 70

Anexo 2: Fórmula utilizada para calcular la cantidad de inserto para VP1. 70

Anexo 3: Fórmula utilizada para calcular la cantidad de inserto para P1-2A 70

Anexo 4: Secuencia obtenida después de la secuenciación del plásmido pFastBac-VP1... 70

1. Introducción

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad que afecta mayormente a animales bovinos, ovinos, caprinos y porcinos. En el Ecuador, esta enfermedad constituye un gran problema económico debido a que las pérdidas del sector ganadero alcanzan hasta los \$25 millones anuales y al parecer, hasta el día de hoy, la erradicación no ha sido efectiva (HOY, 2009). Adicionalmente, la vacuna de virus inactivado utilizada actualmente presenta ciertos problemas de bioseguridad y estabilidad (Saiz et al., 2002) que disminuyen su efectividad y generan inconvenientes en su producción por lo que es necesario buscar alternativas. Una posible solución es la creación de subunidades de vacunas, las cuales tienen como componente principal las proteínas inmunogénicas del patógeno (van Oers, 2006).

En la actualidad, un sistema altamente utilizado para la creación de subunidades de vacunas es el sistema de baculovirus (Bac to Bac), mediante el cual se produce virus recombinantes con las proteínas inmunogénicas del patógeno que posteriormente son expresadas en células de insecto para su análisis (van Oers, 2006). Los genes del virus de la FA con potencial inmunogénico son los de su cápside, los cuales pueden ser utilizados por el sistema Bac to Bac para la creación de posibles subcandidatos de vacunas para esta enfermedad.

1.1 Clasificación y estructura del virus de la Fiebre Aftosa.

La FA es causada por un virus perteneciente a la familia *Picornaviridae* la cual está compuesta por virus de animales que se dividen en cinco géneros: enterovirus, rinovirus,

cardiovirus, aphtovirus y hepatovirus. Estos, son pequeños virus icosaédricos que contienen una sola cadena de ARN positivo con aproximadamente 7,500 pares de bases de longitud y una cadena poli(A) en la región 3' con una longitud de 65 a 100 nucleótidos (Lin, 2009). El ARN viral de la FA codifica para una sola poliproteína la cual pasa por una serie de procesamientos mediados por proteasas virales para producir proteínas maduras. Cuatro de estas proteínas (VP1-VP4) constituyen la cápside del virus las cuales son codificadas por la región P1 del genoma. Las tres primeras proteínas virales (VP1-VP3) se encuentran en la superficie exterior de la cápside del virus y la más corta, VP4, se encuentra en la superficie interior de la cápside. Las proteínas de la cápside se encargan de iniciar la infección mediante el reconocimiento y ligación con los receptores de la membrana de la célula huésped. Para el procesamiento de la poliproteína viral, es necesaria la actividad de las proteasas. En el caso de los picornavirus, las proteasas que actúan son la proteasas 2A y 3C. Las proteasas virales no solo clivan los polipéptidos virales sino también inhiben varias maquinarias de la célula huésped (Lin 2009). Para producir energía, el virus posee la proteína 2C que tiene actividad ATPasa, y su precursora, 2BC sirve como sitio para la replicación del ARN. Para la replicación, el virus posee una polimerasa de ARN dependiente de ARN, codificada por la región 3D del genoma. Esta polimerasa requiere de la proteína 3B, o también llamada VPg, para funcionar como primer e iniciar la síntesis de ARN. En la Figura 1 se puede observar un esquema del genoma del virus de la fiebre aftosa (Strauss y Strauss, 2002; Xu, 2010).

1.2 Epidemiología de la Fiebre Aftosa

La FA, es una enfermedad que afecta a animales bovinos, ovinos, porcinos y caprinos. Existen, en total, 7 serotipos del virus de la FA: A, O, C, Asia I, SAT I, SAT 2 y SAT 3. Los tres primeros serotipos pueden ser encontrados en América y Europa (Li, 2008), Asia I en Asia y SAT 1-3 en África (Brown, 1986).

Los primeros reportes de la enfermedad se dieron en el Reino Unido a partir del año 1839 en Stratford, Londres. Para fines de ese mismo año, la enfermedad se había esparcido por la mayoría de distritos de Inglaterra y ciertos distritos de Escocia, dando indicios de su capacidad infecciosa. El virus de la FA, en Sudamérica, fue reportado por primera vez en el año 1871 en Argentina, luego se encontró en Brasil, Chile y Uruguay después de haber importado ganado bovino desde Europa cuando ocurrió un brote extensivo en 1870. Los primeros reportes de la enfermedad en Perú, Bolivia y Paraguay datan desde 1910, en Colombia y Venezuela desde 1950 y en Ecuador desde 1956. La ocurrencia de la enfermedad en África y Asia no se encuentra documentada pero probablemente empezó con el transporte de animales infectados desde Europa (Brown, 1986).

1.3 Características de la enfermedad de la Fiebre Aftosa

El virus de la FA es transmitido por aerosoles y una vez que ingresa en el animal, se replica primero en la faringe. Posterior a las 24-48 horas de replicación, el virus invade el torrente sanguíneo y en corto tiempo aparecen las lesiones características en la boca y en las patas de los animales susceptibles (Rodríguez y Grubman, 2009). Los síntomas de la enfermedad son fiebre, anorexia, depresión y baja producción de leche y debido a las lesiones en la boca y patas, ocasiona salivación excesiva y cojera (Brown, 1986). La

viremia usualmente desaparece después de 3-4 días pero el virus se replica, altamente, en los sitios donde ocurren las lesiones ($>8 \log_{10}$ unidades infecciosas por mL) y es a partir de éstas que ocurre el contagio con otros animales ya que el virus, fácilmente, se esparce por el aire y por los fluidos corporales. Entre 5 a 10 días después del contagio, las lesiones se resuelven y el virus solo puede ser encontrado en tejidos o fluidos faríngeos (Rodríguez y Grubman, 2009). La mortalidad es baja y usualmente solo mueren los animales jóvenes (Brown, 1986); sin embargo, después de la etapa aguda de la enfermedad existe una pérdida considerable de la condición física del animal y un cese de su crecimiento. Existen casos muy raros en donde la fiebre aftosa se comporta como una enfermedad zoonótica, es decir que puede ser transmitida al humano, pero la infección se presenta con síntomas leves ya que el virus no es específico para humanos y el cruce por la barrera entre especies resulta dificultoso. El último caso reportado en humanos ocurrió en Gran Bretaña en 1966 durante una epidemia de FA. Aún no se establece cuáles son las circunstancias por las cuales el virus puede ser transmitido a humanos, sin embargo, todos los casos que se han reportado son de personas que han tenido contacto cercano con animales infectados. En 1834 existió un reporte sobre tres veterinarios que adquirieron la enfermedad mediante la ingesta de leche cruda de vacas infectadas. No hay reportes de infección con leche pasteurizada (Prempeh, 2001).

1.4 Impacto Económico de la enfermedad de la Fiebre Aftosa

La fiebre aftosa es considerada de gran importancia desde el punto de vista económico ya que por su alto contagio limita el paso de animales infectados, o sus productos derivados, desde un país a otro, así como entre las regiones de un mismo país. En

los últimos años, se ha dado una reintroducción de la enfermedad en algunos países como por ejemplo en el Reino Unido donde, en el 2002, se dio un episodio epizootico devastador que afectó principalmente a ganado bovino y a ovejas; a pesar de que este país se había declarado libre de FA desde 1968. Otros ejemplos claros de la reaparición de la fiebre aftosa es el episodio epizootico ocurrido en 1997 en Taiwan y en el Mercosur y en Sudamérica en el año 2001. Debido a estos sucesos y a la alta capacidad de contagio de esta enfermedad, varios científicos han llegado a considerar la fiebre aftosa como una enfermedad re-emergente (Saiz, 2002).

A pesar de que en Sudamérica se ha visto un declive de la enfermedad, el virus aún persiste en ciertas poblaciones animales de diversas regiones como la región amazónica en Brasil o en países andinos del norte (FAO, 2007). En Ecuador, existen pérdidas del sector ganadero de alrededor de \$25 millones anuales (HOY, 2009), y se han reportado casos tanto del serotipo O como del serotipo A, sin embargo el serotipo O es el más común (FAO, 2007).

1.5 Vacunas

El nacimiento de la inmunología como una ciencia data desde Edward Jenner y la exitosa vacunación contra la viruela en 1796. Las vacunas inducen protección contra infecciones mediante la estimulación y el desarrollo de células efectoras y de memoria de vida larga. Primordialmente, la forma de acción de las vacunas es inducir la producción de anticuerpos por los linfocitos B; los cuales son capaces de reconocer y unirse específicamente a una toxina o a un patógeno para bloquear su acción. Otros efectores inmunológicos son los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos (CTLs) que pueden limitar el

esparcimiento de agentes infecciosos reconociendo y eliminando células infectadas o secretando citoquinas antivirales (Abbas, 2006).

Existen diferentes tipos de vacunas; dentro de las vacunas convencionales están las vacunas inactivadas o atenuadas las cuales están compuestas por microbios intactos no patogénicos. Su forma de preparación consiste en tratar al microbio de tal forma que este no pueda causar enfermedad (es decir que su virulencia sea atenuada) o matando al microbio pero dejando su inmunogenicidad. La ventaja de este tipo de vacunas es que producen altos niveles de inmunidad; sin embargo pueden resultar peligrosas en el caso de uso con sujetos inmunocomprometidos en donde se puede generar enfermedad. También pueden existir reacciones alérgicas hacia los componentes de la vacuna, como en el caso de las proteínas de huevo residuales que se encuentran presentes en las vacunas de la influenza. De igual forma, existe la posibilidad de que el virus atenuado se convierta en una cepa virulenta que se esparza a individuos que no han sido inmunizados (van Oers, 2006). Finalmente, debido a que es necesario cultivar al virus vivo para producir estas vacunas, se necesita una gran cantidad del mismo; lo cual genera un problema de bioseguridad ya que existe la posibilidad de que el virus escape. Es por esta razón que algunos países prohíben la producción de vacunas convencionales de virus altamente infecciosos como es el caso de la producción de vacunas de la FA en Estados Unidos (Saiz et al., 2002).

Una alternativa para las vacunas convencionales pueden ser las vacunas de antígeno purificado o subunidades de vacuna que, como su nombre lo indica, se generan a partir de antígenos purificados provenientes de microbios o toxinas inactivadas y son usualmente administradas con adyuvantes. Estas son vacunas recombinantes que tienen las ventajas de

no contener el material genético del patógeno, no se necesitan grandes cantidades de virus y por ende, estas vacunas no pueden causar enfermedad y no introducen patógenos en regiones no endémicas o en regiones donde se ha erradicado el patógeno. Así mismo, estas vacunas solo poseen el componente inmunodominante lo cual asegura la generación de una respuesta inmunitaria adecuada (van Oers, 2006). Se ha encontrado que entre los candidatos de subunidades de vacunas que han logrado repuesta inmune están los virus de hepatitis B, influenza A, SARS, ébola, fiebre aftosa, entre otros (van Oers, 2006; Li et al., 2008).

Para la creación de subunidades de vacuna de virus, éstas pueden incluir partes de la cápside o la cápside entera pero sin su material genómico (Li et al., 2008). En el caso del virus de la FA, se ha visto que la proteína de la cápside VP1, que es la proteína con más exposición en la superficie de la cápside, ha logrado inducir una alta respuesta de anticuerpos en ganado bovino (Rodriguez y Grubmann, 2009). También, utilizando la cápside completa del virus de FA se ha observado una alta producción de anticuerpos e inmunidad en ganado bovino (Li et al., 2008).

1.6 Descripción de los Baculovirus

La familia *Baculoviridae* corresponde a virus que infectan a invertebrados, los cuales poseen un genoma largo de entre 90 a 160 kilobases, de doble cadena de ADN circular cerrado covalentemente. Se encuentran divididos en los géneros Nucleopolyhedrovirus (NPV) y Granulovirus (GV), basado en la morfología de sus cuerpos de oclusión. Los baculovirus han evolucionado para iniciar la infección en el intestino medio de los insectos. Para lograr esto el baculovirus debe tener dos formas, un cuerpo de oclusión o forma ocluida que es soluble en medio alcalino y resiste fuera de la célula del hospedador y la

forma brotada del virus que es capaz de infectar de una célula a otra (Rohrmann, 2008). El ciclo de infección comienza con los virus en su forma ocluida. Cuando el insecto ingiere el virus, éste llega hacia el intestino medio en donde los niveles de pH pueden estar entre 10 a 12. Esto hace que el cuerpo de oclusión del virus se disuelva y libere a los virus derivados de la oclusión que tienen la capacidad de infectar las células epiteliales del intestino medio. Cuando estos virus infectan las células epiteliales, la forma brotada del virus es liberada. El virus en su forma brotada es capaz de causar una infección sistémica del insecto. Durante la infección tardía, cuando se forman los cuerpos de oclusión alrededor del virus y el núcleo de la célula del insecto está lleno de éstos, las células se lisan y el insecto muere liberando la forma ocluida del virus al ambiente, dónde infectan a otros insectos (Rohrmann, 2008) (Figura 2). Los NPV expresan dos genes, *polihedrina* y *p10*, a muy altos niveles cuando están en una fase tardía de infección (van Oers, 2006). La proteína Polihedrina forma los cuerpos de oclusión viral o polihedra. P10 se encuentra presente en estructuras fibrilares, las cuales funcionan en la ruptura del núcleo de la célula infectada para liberar los polihedra (van Oers, 2006).

1.7 Baculovirus como sistema de expresión de proteínas

Una de las aplicaciones de los baculovirus, incluye su uso como biopesticida debido a que infectan mayormente a lepidópteros. El virus en su estado natural tiene efectos perjudiciales para los insectos huéspedes y puede reducir la afectación de los cultivos agrícolas a cierto grado. Además de esto, se potencia los efectos letales del baculovirus añadiendo, por medio de ingeniería genética, genes que codifican para proteínas tóxicas como la AaIT que provoca parálisis contráctil y muerte en lepidópteros. En la medicina,

usando baculovirus, se han producido auto-antígenos, citocromos, Proteínas G acopladas a receptores, proteínas de la cápside del virus de Herpes simplex con fines de diagnóstico (Patterson et al., 1995). Este sistema también resulta ideal para la producción de antígenos virales con el fin de crear potenciales vacunas para humanos y animales. Es capaz de expresar proteínas recombinantes complejas por la capacidad de las células de insecto de permitir el apropiado doblamiento, modificaciones posttraduccionales, oligomerización y por lo tanto la correcta actividad biológica de la proteína (van Oers, 2006).

1.8 Sistema Bac-to-Bac

El miembro del género NPV, *Autographa californica* multiplepolyhedrovirus (AcMNPV), es un virus que tiene un genoma de 133 kilobases. Este baculovirus es usado para la expresión de genes foráneos en cultivo de células de insecto o larvas. Las líneas celulares usadas en el sistema de expresión se derivan de lepidópteros y generalmente se utilizan líneas de *Spodoptera frugiperda* (Sf9 o Sf21) y células de *Trichoplusia ni* (High Five) (van Oers, 2006). Debido a que los genes de la *polihedrina* y *p10* no resultan esenciales para el virus en el cultivo celular ya que no son necesarios para su replicación y sólo sirven para sobrevivir en el ambiente, son removidos. Los promotores, que son considerados de alto nivel de expresión en fases tardías de la infección, son usados para expresión de genes foráneos que tomarán el lugar de los genes de *polihedrina* y *p10*, lo que forma la base del sistema Bac-to-Bac. Los baculovirus, al tener una morfología filamentosa, una gran cantidad de ADN puede ser acomodada dentro de la partícula viral (van Oers, 2006).

El sistema Bac-to-Bac, emplea la transposición de un cassette de expresión de un gen foráneo de un plásmido donador a un cromosoma bacteriano artificial (BAC) el cual contiene el genoma entero del AcMNPV denominado bacmid. En este sistema, los baculovirus recombinantes son generados en *Escherichia coli* y luego son usados para transfectar células de insecto para tener partículas de baculovirus recombinantes (van Oers, 2006).

Uno de los componentes más importantes de este sistema es el vector pFastBac. Es en este plásmido donde se insertarán los genes de interés. Posee una región denominada mini Tn7 la cual está flanqueada por los sitios Tn7L y Tn7R, los cuales son reconocidos por proteínas de transposición Tn7 y utilizados para la transposición; es solamente esta región del plásmido la que será transpuesta al Bacmid. La región mini Tn7 contiene un gen de resistencia a la gentamicina, un gen de poliadenilación SV40, el cual aumenta la transcripción de ARNm, el promotor de polihedrina, y un sitio de clonación múltiple, el cual contiene varias dianas de restricción. Fuera de la región mini tn7, se encuentra un origen de replicación para *E. coli* y un gen de resistencia a la amplicilina (Invitrogen, 2010). El pFastBac junto con todos sus elementos se puede observar en la Figura 3.

Otro componente vital para el sistema Bac-to-Bac es la cepa de *E.coli* DH10Bac la cual es usada como hospedador para el vector pFastBac. Las células DH10Bac contienen al Bacmid que posee un gen de resistencia a la kanamicina y una región denominada mini *attTn7* que contiene al gen *LacZ*. Es en la región mini *attTn7* donde se inserta la región mini Tn7 del pFastBac; cuando esto sucede, el gen *LacZ* se interrumpe y las colonias en presencia de X-GAL e IPTG crecerán blancas (Invitrogen, 2010). Dentro de esta cepa de *E.*

coli también se encuentra el plásmido ayudador que codifica para proteínas Tn7 necesarias para la transposición y contiene un gen de resistencia a la tetraciclina (Vlak et al., 1996; Invitrogen, 2010). En la Figura 4 se puede ver un esquema de cómo funciona la transposición del pFastBac al Bacmid.

El sistema Bac to Bac ya ha sido utilizado para el análisis de la efectividad de las cápsides vacías de fiebre aftosa con el fin de lograr inmunidad sólida .Estos estudios han demostrado que existió producción de anticuerpos contra el virus de la FA y, por lo tanto, promueven la utilización de este sistema para lograr inmunidad contra esta enfermedad (Li, 2008).

Por lo tanto, este proyecto se centra en el establecimiento del sistema Bac to Bac para el desarrollo de baculovirus recombinantes que contengan proteínas inmunogénicas del virus de la fiebre aftosa, con el fin de crear posibles candidatos de subunidades de vacunas.

2. Justificación

La fiebre aftosa es una enfermedad altamente contagiosa que afecta a bovinos, ovinos, porcinos y caprinos. Éstos al ser de productos de consumo humano, son de alta relevancia económica. Debido a los problemas que acarrea esta enfermedad como la pérdida de millones de dólares en ventas de carne por la infección de ganado con este virus, varios países han decidido tomar medidas de prevención como la vacunación; que busca erradicar la FA para que dichos países puedan declararse libres de la enfermedad, adquiriendo libre acceso a mercados extranjeros (Saiz, 2002). La vacunación del ganado se realiza con una vacuna coctel que contiene diferentes cepas de virus inactivados. Sin embargo, el uso de este tipo de vacuna trae una serie de problemas como una respuesta inmune limitada que no logra una inmunidad sólida, es decir no se previene la enfermedad de manera definitiva; la vacuna no es termoestable sino que necesita de una cadena de frío para mantenerse viable; lo que representa un problema debido a que la vacunación ocurre en zonas rurales donde mantener la cadena de frío resulta dificultoso y al ser necesaria una gran cantidad de virus activos para la producción de vacunas, se necesitan grandes establecimientos y también existe una posibilidad de escape del virus (Saiz, 2002).

Justamente por las limitaciones de la técnica de virus inactivado se necesita buscar alternativas para la creación de nuevas vacunas. Gracias a la tecnología de producción de proteínas recombinantes, se abren las puertas a alternativas para la creación de las subunidades de vacunas. Este tipo de vacunas contienen el componente inmunodominante de un patógeno y en el caso de vacunas virales éstas generalmente son glicoproteínas de la envoltura viral o de la cápside (van Oers, 2006). Debido a que la fiebre aftosa es altamente

contagiosa y representa la pérdida de millones de dólares anuales en el Ecuador y aun no se ha completado su erradicación (HOY, 2009) es necesario que se empiece a investigar una metodología que sea biológicamente segura y efectiva para que en un futuro se pueda generar una vacuna alternativa en contra de esta enfermedad.

También, la implementación de este nuevo sistema de expresión de proteínas recombinantes promete un gran futuro como herramienta para la investigación de la expresión de proteínas con interés científico; como la creación de nuevos candidatos para subunidades de vacunas.

3. Objetivo General

- Crear de Baculovirus Recombinantes que contengan genes codificantes de proteínas inmunogénicas del virus de la fiebre aftosa.

4. Objetivos Específicos

- Detectar el virus de la FA en muestras de ganado infectado.
- Estandarizar la amplificación de genes estructurales del virus de la FA: VP1 y P12A
- Crear constructos con los genes inmunogénicos de la FA en el plásmido donante pFastBac del sistema BactoBac.
- Crear Baculovirus recombinantes con los genes VP1, P1-2A y P1-2A-3C del virus de la FA, utilizando el sistema de BactoBac.

5. Área de Estudio

Las muestras de tejido de epitelio de lengua de ganado bovino infectado con el virus de la fiebre aftosa fueron donadas por el Instituto Nacional de Higiene del Ecuador (INH) y fueron obtenidas de ganado vacuno infectado dentro del Ecuador.

La extracción de ARN y amplificación por RT-PCR fueron realizadas en el Laboratorio de Inmunología del Hospital de los Valles Universidad San Francisco de Quito. La extracción de plásmido, restricción enzimática, ligación, transformación, transposición y extracción de Bacmid fueron realizados en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad San Francisco de Quito.

6. Materiales

6.1 Extracción de ARN

- E.Z.N.A total RNA Kit I (Omega Bio-Tek)
- Centrífuga Eppendorf 5804
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)

6.2 Retrotranscripción y Reacción en cadena de la polimerasa

- SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity (Invitrogen)
- Termociclador Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)

- UltraPure Agarose (Invitrogen)
- Sybr Safe (Invitrogen)
- Fotodocumentador BIO-RAD modelo Molecular Imager Gel Doc XR
- TBE 1X (Tris – Acido Borico – EDTA)
- Cámara de electroforesis Enduro Gel XL (Labnet)

6.3 Purificación de gel y PCR

- Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega)
- Tubos eppendorf 1.5 mL
- Fotodocumentador BIO-RAD modelo Molecular Imager Gel Doc XR
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)
- UltraPure Agarose (Invitrogen)
- Sybr Safe (Invitrogen)
- Cámara de electrophoresis Enduro Gel XL (Labnet)

6.4 Extracción de plásmido

- Tubos de ensayo con tapa
- Ampicilin sodium salt (GIBCO)
- Bacto Peptona (BD Biosciences)
- Bacto extracto de levadura (BD Biosciences)
- Cloruro de Sodio (Merck)
- TENS Buffer (10 mM de Tris.Cl a pH 8, 1mM de EDTA, 0.1 N NaOH y 0.5% de SDS)

- Acetato de potasio 5M
- Etanol al 100%
- Etanol al 70%
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- Centrífuga Spectrafuge 24D (Labnet)
- Incubadora WiseCube Fuzzy Control System (Wisd Laboratory Instruments)
- Nanodrop 1000 (Thermo Scientific)

6.5 Restricción enzimática

- Enzima BamHI (Promega)
- Enzima EcoRI (Promega)
- Enzima HindIII (Promega)
- Multicore Buffer (Promega)
- BSA (Promega)
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)
- Incubadora WiseCube Fuzzy Control System (Wisd Laboratory Instruments)
- Cámara de electrophoresis Enduro Gel XL (Labnet)
- UltraPure Agarose (Invitrogen)
- Sybr Safe (Invitrogen)
- Fotodocumentador BIO-RAD modelo Molecular Imager Gel Doc XR
- Blue Juice 10X Loading Buffer (Invitrogen)

6.6 Ligación

- T4 DNA ligase (Invitrogen)
- Buffer de ligase (Invitrogen)
- UltraPure™ Distilled Water (GIBCO)

6.7 Transformación Bacteriana

- Bacterias *E. coli* DH10B
- Bacto Peptona (BD Biosciences)
- Bacto extracto de levadura (BD Biosciences)
- Cloruro de Sodio (Merck)
- Bacto Agar (BD Biosciences)
- Ampicilin sodium salt (GIBCO)
- Incubadora con agitación MaxQ 4000 (Barnstead)
- K centrifuge PLC series (centrífuga para tubos de ensayo)
- Solución 60 mM de CaCl₂ a pH 7.5
- Solución 100 mM de CaCl₂ + 15% de glicerol
- Etanol 70%
- Incubadora WiseCube Fuzzy Control System (Wisd Laboratory Instruments)

6.8 Transposición

- Bacterias *E. coli* DH10Bac
- Sulfato de kanamicina (GIBCO)
- Tetraciclina (Genfar 500mg)

- Gentamicin Reagent Solution (GIBCO)
- X-GAL (Promega)
- IPTG (Promega)
- Bacto Agar (BD Biosciences)
- Bacto Extracto de levadura (BD Biosciences)
- Bacto Peptona (BD Biosciences)
- Incubadora WiseCube Fuzzy Control System (Wisd Laboratory Instruments)
- Cloruro de Sodio (Merck)
- Incubadora con agitación MaxQ 4000 (Barnstead)
- K Centrifuge PLC Series (Centrífuga para tubos de ensayo)
- Solución 60 mM de CaCl₂ a pH 7.5
- Solución 100 mM de CaCl₂ + 15% de glicerol

6.9 Extracción de Bacmid

- Bacto Agar (BD Biosciences)
- Bacto Extracto de levadura (BD Biosciences)
- Bacto Peptona (BD Biosciences)
- Cloruro de Sodio (Merck)
- Sulfato de kanamicina (GIBCO)
- Tetraciclina (Genfar 500 mg)
- Gentamicin Reagent Soution (GIBCO)
- Solución GTE (50 mM glucosa, 10mM EDTA, 25 mM Tris/HCl a pH8, 0.1 mg/mL RNasa)

- Solución de NaOH/SDS (0.2 M NaOH, 1% SDS)
- Acetato de potasio 5M
- Isopropanol 91% (Merck)
- Etanol 70%

7. Métodos

7.1 Detección molecular del virus de la Fiebre Aftosa.

7.1.1 Obtención de muestras de epitelio de lengua de ganado vacuno infectado

Cinco muestras de epitelio de lengua de ganado vacuno, que presentaba síntomas de fiebre aftosa, fueron donadas por el Instituto de Zoonosis del INH. Estas muestras, rotuladas como 86, 226, 80, 98 y 223, ya se encontraban infectadas con el virus de FA serotipo O como se puede observar en la Tabla 1.

7.1.2 Extracción de ARN total de las muestras de epitelio de lengua de ganado bovino infectado

Se extrajo el ARN total de las muestras de epitelio, utilizando el kit de EZNA total RNA kit I (Omega Bio-Tek), basado en columnas. Este protocolo corresponde al de Omega Bio-Tek (2009). Se utilizó alrededor de 25 mg de epitelio de lengua infectado y se lo molió utilizando nitrógeno líquido, un mortero y un pistilo. Se colocó la muestra en un tubo eppendorf de 1.5 mL más 700 μ L de bufer de lisis TRK y se la homogenizó con pistilos. Se centrifugó a máxima velocidad (13000 rpm) por 5 minutos y se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf de 1.5 mL. Se añadió 700 μ L de etanol al 70% y se mezcló utilizando la micropipeta. Se transfirió la mezcla a una columna de centrifugación HiBind RNA

colocada sobre un tubo de colección de 2 mL. Se centrifugó a 10000 x g por 1 minuto a temperatura ambiente y se descartó lo que cayó de la columna. Se añadió 500 µL de RNA Wash Buffer I, se centrifugó a 10000 x g por 30 segundos. Se descartó el decantado y se volvió a centrifugar la columna con el tubo vacío para secar la matriz de la columna. Se eluyó el ARN colocando 50 µL de agua de PCR en el centro de la matriz de la columna y se midió en nanodrop 1000 (Thermo Scientific) la concentración del ARN obtenido.

7.1.3 Primers utilizados para detección molecular del virus de FA

Los primers para la detección molecular del virus de la FA se basaron en el Manual de Fiebre Aftosa de Malirat y Bergmann (2003). Las secuencias de los primers se encuentran en la Tabla 2.

7.1.4 Amplificación del ARN del virus

A partir del ARN total extraído, se procedió a identificar la presencia del material genético del virus. Para esto se utilizó el kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity, el cual posee una retrotranscriptasa y una polimerasa para lograr la retrotranscripción y el PCR en una sola reacción. Se amplificó con los primers para el serotipo O que amplifican la toda la región del gen VP1 del virus (Malirat y Bergmann, 2003). Se colocó 25 µL de Reaction mix (1X), 5 µL de ARN, 1 µL de primer forward (0,2 µM), 1µL de primer reverse (0,2 µM), 1µL de Superscript III RT/Platinum taq y 17 µL de agua de PCR para un volumen final de 50 µL.

El programa de RT-PCR para el serotipo O, tomado del manual de Fiebre Aftosa de Malirat y Bergmann (2003), consistió en los siguientes ciclos: 55°C por 30 minutos para la

retrotranscripción, seguido de 35 ciclos de denaturación a 94°C por 1 minuto, 60°C por 45 segundos de temperatura de annealing y 72°C por 2 minutos de elongación y una extensión final de 72°C por 5 minutos. Se observaron los resultados en gel de agarosa al 1%.

7.2 Creación de constructos

Los constructos propuestos para esta investigación fueron el gen de la cápside viral VP1, el conjunto de genes estructurales P1 más la proteasa 2A (P1-2A) y P1-2A más la proteasa 3C. El esquema para cada uno de estos constructos se puede observar en la Figura 5.

7.2.1 Diseño de primers para amplificar genes estructurales del virus de la FA

El diseño de los primers se realizó en base a la secuencia de los genes de la cápside del virus VP1, P1-2A y 3C. La búsqueda de estas secuencias se la realizó en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Luego de que se obtuvieron las secuencias de los genes, se utilizó el programa Primer Blast del NCBI para escoger la secuencia de los primers. Los primers se seleccionaron en base a la longitud del producto de PCR, temperatura de melting y porcentaje de Citosinas y Guaninas. Además, fue necesario incluir en su secuencia sitios de restricción enzimática para el proceso de clonación y secuencias que soporten la expresión de los genes. Los primers forward se diseñaron con un sitio de restricción, seguido de una secuencia consenso Kozak, la cual es una secuencia adyacente al codón de inicio que aumenta la eficiencia de la traducción y por lo tanto la expresión del gen (Ólafsdóttir et al., 2008), y un codón de inicio. Los primers reverse contuvieron un sitio de restricción seguido de un codón de alto. Todos los primers forward y reverse tuvieron nucleótidos extra en sus extremos seguidos del sitio de restricción para ayudar a la eficiencia de las enzimas. En el caso del par de primers para

VP1, el sitio de restricción en el primer forward es reconocido por la enzima BamHI y en el primer reverse por la enzima HindIII. Para los genes P1-2A, se diseñó el primer forward con el sitio de restricción para BamHI y el primer reverse para EcoRI. Finalmente, para el set de primers del gen 3C, se diseñó el primer forward con un sitio de restricción para EcoRI y el primer reverse para HindIII. Debido a que el gen 3C no está adyacente al gen P1-2A, se utilizó un mismo sitio de restricción para los dos. Por esto es que el sitio de restricción para EcoRI se lo colocó en el primer reverse del set de primers para P1-2A y en el primer forward para el gen 3C. El set de primers se los puede observar en la Tabla 3. Todos los sitios de restricción utilizados para el diseño de los primers se encuentran dentro del sitio de clonación múltiple del plásmido.

7.2.2 Amplificación de los genes estructurales

Utilizando la misma extracción de ARN que se utilizó para la identificación molecular del virus de la FA, se hizo retrotranscripción para pasar de ARN a ADNc seguido de PCR para amplificar los genes VP1, P1-2A y 3C con los primers específicos para cada gen. Para esto se utilizó el kit SuperScript™ III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq High Fidelity, el cual se utilizó para la retrotranscripción y el PCR en una sola reacción. Se colocó 25 µL de Reaction mix (1X), 5 µL de ARN total, 1 µL de primer forward (0,2 µM), 1µL de primer reverse (0,2 µM), 1µL de Superscript III RT/Platinum taq y 17 µL de agua de PCR para completar el volumen de reacción hasta 50 µL.

El programa de RT-PCR para los genes VP1 y 3C, fue de 55°C por 30 minutos para la retrotranscripción, seguido de 35 ciclos de denaturación a 95°C por 2 minutos, 60°C por 15 segundos y 55°C por 15 segundos de temperatura de annealing, 72°C por 2.5 minutos de

elongación y una extensión final a 72°C por 5 minutos. El programa de RT-PCR para el gen P1-2A fue de 55°C por 30 minutos para la retrotranscripción, seguido de 35 ciclos de denaturación a 95°C por 2 minutos, 67°C por 15 segundos y 65°C por 15 segundos de temperatura de annealing más 72°C por 2.5 minutos de elongación y una extensión final a 72°C por 5 minutos. Los amplicones fueron observados en gel de agarosa al 1%.

7.2.3 Purificación de los genes estructurales amplificados

Se purificaron los productos PCR de la amplificación de los genes estructurales utilizando Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. Se añadió un volumen de Membrane Binding Solution igual al volumen del producto de PCR (50 µL). El protocolo fue modificado del protocolo original de Promega (2010). Se transfirió la mezcla del producto de PCR con la Membrane Binding Solution a una SV Minicolumn colocada sobre un tubo de colección. Se incubó la mezcla por 1 minuto a temperatura ambiente. Se centrifugó a 16000 x g por 2 minutos. Se descartó el líquido del tubo de colección, se lavó la columna con 700 µL de Membrane Wash Solution y se centrifugó a 16000 x g por 2 minutos. Se repitió el lavado con 500 µL de Membrane Wash Solution y se centrifugó a 16000 x g por 6 minutos. Se realizó una centrifugación más a 16000 x g por 2 minutos para permitir la evaporación de los restos de etanol. Se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se colocó 50 µL de agua de PCR en el centro de la columna. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 16000 x g por 2 minutos y se conservó el producto de PCR purificado a -20 °C.

7.2.4 Extracción del plásmido pFastBac

Con el fin de obtener el vector pFastBac para la clonación de los genes estructurales de la FA, se utilizó el protocolo de extracción de lisis alcalina mini-prep. Para este propósito, se cultivó *E. coli* DH5 α que contienen el pFastBac en un tubo de ensayo con 10 mL de caldo Luria-Broth (LB) suplementado con ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g/mL}$ a 37°C por toda la noche. Al día siguiente se colocó 1.5 mL de cultivo un tubo eppendorf y se centrifugó a 12000 rpm por 1 minuto. Se eliminó el sobrenadante dejando alrededor de 50 μL y se resuspendió las células mediante fuerte agitación. Se añadió 300 μL de buffer TENS, el cual contenía 10 mM de Tris.Cl a pH 8, 1mM de EDTA, 0.1 N NaOH y 0.5% de SDS. En la misma mezcla se añadió 150 μL de acetato de potasio 5M a pH 5.2 y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos para precipitar detritos celulares y ADN cromosómico. Se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf de 1.5 mL y se añadió 900 μL de etanol al 100% a temperatura ambiente, mezclándolo por inversión. Se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 1 mL de etanol al 70% a -20°C y se volvió a centrifugar a 12000 rpm por 3 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet. Se resuspendió el pellet con 30 μL de agua de PCR, se pipeteó hasta la completa disolución del pellet.

7.2.5 Restricción Enzimática de los genes estructurales y del vector

Para la clonación, primeramente, se realizó restricción enzimática del producto de PCR purificado de VP1 y P1-2A y el pFastBac. Para VP1 se utilizó las enzimas BamHI y HinDIII, las mismas enzimas se utilizaron para cortar al plásmido pFastBac. Para P1-2A se utilizaron las enzimas EcoRI y BamHI, estas mismas enzimas se utilizaron para cortar el

pFastbac. Se utilizó un protocolo modificado a partir del protocolo de Promega (2011). El mix de restricción consistió de Buffer Multi-Core a 1X (3 μ L), Enzimas de restricción 5U/ μ L de cada una (0,5 μ L), 1 μ g de ADN (10 μ L), BSA 1X (0,5 μ L) y agua de PCR para completar la reacción a 30 μ L (15.5 μ L) en vez de una reacción de 15 μ L como sugiere el protocolo. Se dejó el mix en la incubadora a 37°C por 4 horas. Posteriormente, se observaron los resultados de la restricción enzimática en un gel de agarosa al 0.75%.

6.2.7 Purificación de los productos de la restricción enzimática

Al igual que la purificación de productos de PCR, la purificación de los productos de la restricción enzimática, se la realizó con Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. El método que se utilizó fue modificado a partir del protocolo de Promega (2010) en donde todos los tiempos de centrifugación fueron aumentados al doble. Se visualizaron las bandas en un fotodocumentador BIO-RAD modelo Molecular Imager Gel Doc XR y se cortaron las bandas deseadas, depositándolas en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se colocó Membrane Binding Solution en un radio de 10 μ L por 10 mg de gel de agarosa. Se incubó a 50°C y se agitó cada 2 minutos hasta observar que la agarosa se había disuelto en la solución. Se transfirió la solución a una SV Minicolumn ensamblada con un tubo de colección y se incubó por un minuto a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 16000 x g por 2 minutos y se lavó la columna con 700 μ L de Membrane Wash Solution, repitiendo la misma centrifugación. Se repitió el lavado con 500 μ L de Membrane Wash Solution y se centrifugó a 16000 x g por 6 minutos. Se eliminó el líquido que quedó en el tubo de colección y se centrifugó de nuevo a 16000 x g por 2 minutos para permitir la evaporación de los residuos de etanol. Se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 mL y se

colocó 50 μL de agua de PCR en el centro de la columna dejando en incubación por 5 minutos a temperatura ambiente. Al final, se centrifugó a 16000 x g por 2 minutos y se conservó el ADN purificado a -20C .

7.2.6 Ligación

Para el proceso de ligación se utilizaron los pedazos purificados de la restricción de los genes VP1 y P1-2A y el producto de la restricción del plásmido sin purificar. Para la ligación se modificó el protocolo de Invitrogen (2002) utilizando un ratio mayor de vector/inserto y dejando la reacción de ligación por una mayor cantidad de tiempo. Para calcular la cantidad de vector y la cantidad de inserto se utilizó la fórmula que se observa en el Anexo 1. El ratio que se utilizó fue de 1:5 (1 parte de vector y 5 partes de inserto) con un mínimo de concentración de plásmido de 50 ng. Se colocó el buffer de la ligasa a 1X (1 μL), T4 DNA ligasa 1U (1 μL), la cantidad de inserto y vector adecuadas de acuerdo a la fórmula del Anexo 1 y agua hasta llegar a los 10 μL . Se dejó a 4°C por 3 días. En los Anexos 2 y 3 se pueden observar las cantidades de inserto necesarias para VP1 y P1-2A.

7.2.7 Transformación Bacteriana

El protocolo de transformación bacteriana, primeramente, requirió la creación de células competentes. Para este propósito se inoculó *E. coli* DH10B en un tubo con 5 mL de caldo LB por toda la noche, a 37°C . Al siguiente día, para preparar las células competentes, se diluyó la suspensión bacteriana en caldo LB en una relación de 1:50 y se incubó en agitación a 37°C por 3 horas. Se colocó 10 mL del cultivo a dos tubos de ensayo autoclavados. Se centrifugó a 6000 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado en 5 mL de una solución de 60 mM de CaCl_2 a pH 7.5 a 0°C . Se

centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió el precipitado de bacterias en 1 mL de solución de 60 mM de CaCl_2 a pH 7.5 y se incubó en hielo por 1 hora. Luego se centrifugó a 3000 rpm por 5 minutos y se resuspendieron las células en 500 μL de una solución de CaCl_2 100 mM + 15% de glicerol. Se realizaron 20 alícuotas, de 50 μL cada una, de células competentes que se guardaron a -80°C .

Una vez realizada la competencia bacteriana se procedió a preparar la transformación para lo cual se utilizó la ligación del pFastBac con el inserto y como control se utilizó el pFastBac solo. Se añadió el plásmido ligado a una de las alícuotas de células competentes y el plásmido sin ligar a otra, esto se lo mantuvo en hielo por 10 minutos. Luego se realizó un shock térmico a 42°C por 50 segundos y, nuevamente, se colocó en hielo por 2 minutos. Seguido de esto, se añadió 1 mL de medio LB y se incubó a 37°C por 30 minutos para que las bacterias se recuperen del shock térmico. Luego de la incubación de las bacterias, se sembró 100 μL de las células transformadas sobre medio LB sólido suplementado con ampicilina a una concentración de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó a 37°C por toda la noche. Al día siguiente se tomaron las bacterias que crecieron y se sembraron en caldo LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 16 horas. Posteriormente, se extrajo el plásmido con el protocolo de lisis alcalina miniprep, descrito anteriormente, y se hizo un screening con restricción enzimática para confirmar la presencia del inserto dentro del plásmido. Para cada colonia que fue clonada con éxito, se realizaron stocks utilizando el medio LB líquido con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y glicerol al 10% en crioviales de 1,5 mL que se guardaron a -20°C y -80°C .

7.2.8 Sistema Bac to Bac

Se utilizó el sistema Bac to Bac para la generación de bacmids recombinantes. Este sistema consta de células especiales de *E. coli*, llamadas DH10Bac, las cuales contienen el bacmid con gen de resistencia a la kanamicina y el plásmido ayudador con gen de resistencia a la tetraciclina. De acuerdo al protocolo del manual Bac-to-Bac de Invitrogen (2010), primeramente fue necesario generar células competentes cuyo procedimiento es el mismo que para las células DH10 β mencionado en la sección. 7.2.7. Igualmente, se hicieron alícuotas de células DH10Bac y se guardaron a -80°C.

Posteriormente, se utilizaron estas alícuotas de DH10Bac competentes para su transformación con los constructos de pFastBac. Se añadió el plásmido con el inserto en una concentración de 800 ng y se incubó en hielo por 30 minutos. Luego se realizó shock térmico a 42°C por 50 segundos y una posterior incubación en hielo por 2 minutos. Se añadió 900 μ L de caldo LB y se agitó a 225 rpm a 37°C por 4 horas, tiempo durante el cual ocurre la transposición de los constructos del plásmido pFastBac al bacmid que de ser positiva resulta en una interrupción del gen LacZ del bacmid. Finalmente se sembró 100 μ L de la suspensión bacteriana en medio LB sólido suplementado con kanamicina (50 μ g/mL), tetraciclina (10 μ g/mL), gentamicina (7 μ g/mL), X-Gal (80 μ g/mL), IPTG (40 μ g/mL) y se incubó por 48 horas a 37°C. Las colonias lac negativas (crecen de color blanco) fueron seleccionadas y se cultivaron en LB líquido suplementado con kanamicina (50 μ g/mL), tetraciclina (10 μ g/mL) y gentamicina (7 μ g/mL). Finalmente, de estas colonias se extrajo el Bacmid y se utilizó PCR para confirmar la presencia del inserto dentro del Bacmid. Las colonias positivas para el screening fueron almacenadas como stocks en

medio LB líquido con kanamicina (50µg/mL), tetraciclina (10µg/mL) y gentamicina (7 µg/mL) y glicerol al 10% en crioviales, a -20°C y -80°C.

7.2.9 Extracción de Bacmid

El protocolo de extracción de Bacmid fue modificado del protocolo del manual Bac-to-Bac de Invitrogen (2010). Se tomó 1.5 mL de células que crecieron en medio LB suplementado con kanamicina (50µg/mL), tetraciclina (10µg/mL) y gentamicina (7µg/mL) y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL. Se centrifugó a 2000 x g por 15 minutos a 4 °C y luego se eliminó el sobrenadante. Se añadió 200 µL de GTE frío (50 mM de glucosa, 10 mM de EDTA, 25 mM de Tris/HCl, 0.1 mg/mL de RNAasa), luego se añadió 400 µL de solución de NaOH/SDS (0.2 M NaOH y SDS al 1%). Seguido de esto se colocó una solución de acetato de potasio 5M y se mezcló el tubo por inversión. Se centrifugó por 10 minutos a máxima velocidad y se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo eppendorf de 1.5 mL. Se añadió 600 µL de isopropanol a temperatura de hielo y se mezcló por inversión. Se centrifugó a máxima velocidad por 15 minutos y se eliminó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 500 µL de etanol al 70% y se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos. Se secó el pellet y se añadió 30 uL de agua de PCR.

8. Resultados

8.1 Identificación molecular del virus de la Fiebre Aftosa

8.1.1 Extracción de ARN total

Se midió la concentración de las extracciones de ARN en nanodrop 1000 (Thermo Scientific) y se obtuvieron concentraciones de 43.1 ng/ μ L en la muestra 80, 52.4 ng/ μ L en la muestra 86, 22.4 ng/ μ L en la muestra 98, 11.3 ng/ μ L de la muestra 223 y 24.3 ng/ μ L en la muestra 226

8.1.2 Amplificación de ARN del virus

Se logró amplificar el ADN del serotipo O de las muestras de epitelio de ganado vacuno, utilizando primers específicos que se pueden observar en la Tabla 1. En la Figura 6 se puede observar que dos de las muestras de las cuales se extrajo el ARN viral amplificaron para este serotipo. Estas muestras son la 226 y la 86 en donde se observa una banda alrededor de 1300 pb. Las muestras 80, 98 y 223 no amplificaron para el serotipo O.

8.2 Creación de constructos

8.2.1 Amplificación de genes estructurales

Se llegó a estandarizar el protocolo de amplificación de los genes estructurales del virus de la FA. En la Figura 7 se puede observar la amplificación de los genes VP1 y 3C del serotipo O que tienen un tamaño de 642 y 640 pb respectivamente. En la Figura 8 se puede observar la amplificación del gen P1-2A que tiene un tamaño de 2250 pb.

8.2.2 Extracción del plásmido pFastBac

En la Figura 9 se puede observar el resultado de la extracción de plásmido por medio del método de lisis alcalina miniprep. El tamaño del plásmido es de 4775 pb.

8.2.3 Restricción enzimática, purificación y ligación de constructos

Se logró realizar la restricción enzimática del pFastBac como se puede observar en la Figura 10, el pFastbac se linearizó y se lo puede observar a la altura de 4775 pb.

También se logró la restricción enzimática del gen VP1 como se puede observar en la Figura 11, el tamaño de banda que se observa es el correspondiente al gen, 642 pb. El gen P1-2A se cortó en la mitad debido a la presencia de un sitio de restricción para BamHI en el nucleótido 1592 y por lo tanto se observa que el gen fue cortado por la mitad resultando en dos bandas de 1000 y 1200 pb.

La purificación del producto de la restricción enzimática a partir de geles de agarosa al 0.75%, en el caso de VP1, resultó exitosa. Se obtuvieron concentraciones de hasta 66.4 ng/ μ L, lo cual, de acuerdo a la fórmula en el Anexo 2, requirió que se colocaran 0,5 μ L del inserto VP1 en el mix de ligación. En el caso de P1-2A, al existir el problema del sitio de restricción para BamHI en la mitad del gen, se tomó el fragmento que poseía el tamaño de 2250 pb, aunque el fragmento se visualizara muy tenue en el gel de agarosa. Las concentraciones obtenidas después de la purificación resultaron ser muy bajas como para poder usarse en el mix de ligación.

8.2.4 Transformación bacteriana con los constructos

Se obtuvieron 7 colonias positivas para el constructo pFastBac-VP1 pero no se logró clonar el gen de P12A. Para comprobar que efectivamente VP1 fue clonada dentro del vector de pFastBac se realizó la extracción del plásmido pFastBac de las 7 colonias ampicilina resistentes y una restricción enzimática de dichos plásmidos. De estas colonias, 5 resultaron ser positivas para el gen VP1 como se observa en la Figura 12 la presencia de dos bandas: una correspondiente al pFastBac de 4775 pb y la banda correspondiente al gen VP1 de 642 pb. Además, se compara el tamaño entre pFastBac-VP1 y pFastBac sin el inserto, presentados en la Figura 13, dónde se puede observar que pFastBac-VP1 presenta una banda ligeramente mayor al pFastBac sin inserto debido a que contiene una mayor cantidad de pares de bases.

Para confirmar que el vector pFastBac poseía el gen VP1, se mandó a secuenciar el plásmido pFastBac-VP1 a Functional Biosciences, utilizando los primers para amplificar el gen VP1. Después de tener la secuencia, se realizó un alineamiento múltiple utilizando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) y se obtuvo que la secuencia obtenida se alineó con una secuencia que correspondía al gen VP1 perteneciente al serotipo O del virus de la FA de la provincia de Santo Domingo de Tsáchilas con un Expect value (E value) de 0 y con un porcentaje de similitud del 94%. El código de acceso corresponde a JN005912.1. La secuencia de nucleótidos se puede observar en el Anexo 4.

8.2.5 Creación de baculovirus recombinantes con el Sistema Bac-to-Bac

La transposición fue positiva por lo que se crearon bacmids recombinantes para VP1. El crecimiento de las colonias se puede observar en la Figura 14, donde las colonias

blancas tuvieron una transposición positiva del pFastBac-VP1 debido a que el gen LacZ que se encuentra dentro de la región mini-*att*Tn7 del Bacmid (sitio de unión del transposón bacteriano) fue interrumpido por la región mini-Tn7 del plásmido pFastBac por acción del plásmido ayudador. Las colonias que crecieron azules son consecuencia de una transposición de la región mini-Tn7 del plásmido pFastBac dentro de la región mini-*att*Tn7 del cromosoma bacteriano, donde no interrumpe el gen LacZ (Vlak et al., 1996). De un total de 20 colonias Lac negativas, se extrajo al azar el bacmid de 5 colonias y se analizó por PCR la presencia del gen VP1. En la Figura 15 se puede observar la extracción del Bacmid de las 5 colonias junto con el PCR en donde se observa la banda de 642 pb de VP1 en cada uno de los Bacmids extraídos.

8. Discusión

La fiebre aftosa es una enfermedad causada por un virus que aun afecta a la producción de ganado. Existen 7 serotipos del virus y no existe inmunidad cruzada entre los serotipos (Li et al., 2008). Debido a las limitaciones que posee la vacuna de virus inactivado, utilizada para prevenir brotes de FA (Saiz, 2002), es necesario buscar alternativas para su prevención. Una alternativa interesante es el establecer un sistema de expresión de proteínas inmunogénicas del virus que pueden ser utilizadas como posibles candidatos para el desarrollo de subunidades de vacunas.

La inmunogenicidad de las proteínas estructurales del virus de la FA ha sido demostrada anteriormente en varios estudios. Li et al. (2008), demostraron que utilizar el constructo producto de la expresión del constructo P1-2A-3C, del serotipo Asia 1, como una subunidad de vacuna en ganado bovino, generaba una alta producción de anticuerpos e

inmunidad hacia la enfermedad. La proteína VP1 además de ser parte del grupo de genes de P1, es la proteína que se encuentra más expuesta en la superficie de la cápside (Rodríguez y Grubmann, 2009) y contiene epítomos responsables de inducir la producción de anticuerpos e inmunidad (Wigdorovitz et al., 1998). Por lo tanto, en este proyecto, el gen inmunogénico VP1, el grupo de genes inmunogénicos P1, y los genes para las proteasas 2A y 3C fueron elegidos como candidatos para la creación de baculovirus recombinantes utilizando el sistema Bac to Bac.

De acuerdo con datos de la organización mundial de sanidad animal, en el 2006 se encontró que existieron 41 brotes de fiebre aftosa del serotipo O en el Ecuador, lo que lo hace el serotipo más prevalente (FAO, 2007) y, por lo tanto, el serotipo de interés para este estudio. Es por esta razón que a partir de epitelio de vacas infectadas, se logró amplificar el ADN del serotipo O del virus, el cual fue utilizado para el diseño de primers y amplificación de sus genes estructurales.

Para el diseño de primers, además de la región de complementariedad con los genes estructurales, se añadieron sitios de restricción para facilitar la inserción de los genes dentro del vector pFastBac. Además de los sitios de restricción fue necesario añadir nucleótidos extra antes de los sitios de restricción, en los extremos 5' de los primers para que la enzima reconozca de mejor manera el sitio de restricción y asegurar un corte eficiente (McPherson y Moller, 2000). Fue necesario también, añadir los codones de inicio y fin junto con la secuencia kozak debido a que estos genes pasarán por un proceso de transcripción y traducción en un sistema de células eucariotas (Phillips, 2002). También se tomó en consideración el sentido de lectura del plásmido y el orden en el que se encontraban los

sitios de corte para las enzimas BamHI, EcoRI y HindIII (Figura 3). Los sitios de restricción colocados en los primers forward y reverse para P1-2A VP1 y 3C iban de acuerdo al orden en el que están dispuestos dentro del sitio de clonación múltiple en el plásmido. De esta manera, se asegura que la inserción de los genes se dará en el sentido de lectura del plásmido y no al revés.

Al no existir un protocolo estandarizado para la amplificación de los genes estructurales del virus, se debió probar con diferentes temperaturas de annealing hasta lograr una amplificación positiva de los mismos. Como se observa en la Figura 7 y 8, los productos de amplificación de los genes estructurales VP1, P1-2A y 3C, poseen los tamaños esperados 642, 2250 y 640 pb respectivamente. Las temperaturas de annealing utilizadas para la amplificación de los genes estructurales se las puede observar en la Tabla 1.

A pesar de que se logró la clonación del gen VP1 al pFastBac, los genes P1-2A no se lograron clonar y por ende tampoco el constructo P1-2A-3C. Las enzimas de restricción que cortaban a P1-2A eran EcoRI y BamHI. El gen P1-2A posee un sitio de corte para la enzima BamHI a partir del nucleótido 1592 y como se puede observar en la Figura 11, la restricción enzimática ocurre más eficientemente en la mitad del gen por lo que se puede observar que las bandas más intensas corresponden a cada una de las mitades del gen. Esto ocurre debido a que los primers poseían 3 nucleótidos; la mínima cantidad de nucleótidos extra recomendados (de 3 a 10 nucleótidos) en el lado 5' del primer, para mejorar la eficiencia de la restricción enzimática (McPherson y Moller, 2000).

La secuencia obtenida a partir del plásmido pFastBac-VP1 tuvo un valor E de 0 (el cual es un parámetro que mide la significancia del acierto de la secuencia con la base de datos) lo que significa que la probabilidad de que el alineamiento de la secuencia dentro del pFastBac con la base de datos haya sido al azar es mínima (BLAST, n.f.). Por lo tanto, es seguro concluir que la secuencia que se clonó dentro del plásmido pFastBac es el gen VP1 perteneciente al virus de la FA serotipo O. A parte de la homología con el gen VP1 del serotipo O de la provincia de Santo Domingo de Tsáchilas, se encontró también en la base de datos de BLAST que la secuencia se alineaba con este mismo gen proveniente de la provincia de Orellana (código de acceso JN005918.1), Napo (JN005917.1), Bolívar (JN005916.1), Imbabura (JN005915.1), Cotopaxi (JN005914.1) y Los Ríos (JN005911.1). Estos alineamientos tenían el mismo E value de 0 y un 94% de homología por lo que también se puede asegurar que este mismo serotipo está circulando por varias provincias pertenecientes a las regiones de la Costa, Sierra y Oriente del Ecuador.

A pesar de que el constructo VP1 si genera inmunidad en ganado vacuno, ésta no es tan efectiva como la de la vacuna inactivada. Esto se debe a que la proteína VP1 expresada sin proteasas y sin el resto de las proteínas estructurales de la cápside, no puede doblarse de manera correcta y debido a esto, la exposición de sitios de reconocimiento por el sistema inmune es limitada y por lo tanto la inmunidad generada no es tan efectiva (Saiz et al., 2002). Por otro lado, Li et al. (2008) lograron expresar el constructo P1-2A-3C en el serotipo Asia 1 y este si mostró una inmunidad mayor debido a la presencia de la proteasa 2A y a la proteína 3C que logran el doblamiento y procesamiento adecuado de la cápside. Esto hace pensar que el constructo de P1-2A-3C en el serotipo O sería la mejor opción para

un candidato de subunidad de vacuna. Otro factor que ayuda a la inmunización de ganado vacuno es agregar el gen de interferón alfa bovino al constructo, con el cual se ha observado que la inmunización ocurre de manera más rápida y más eficiente (Grubman, 2005), lo cual sería importante tomar en cuenta para la construcción de los siguientes baculovirus recombinantes.

Finalmente, se logró estandarizar un protocolo para la generación de baculovirus recombinantes. Para lo cual, es necesario continuar con la expresión del gen VP1 en la línea celular sf9 (van Oers, 2006) para la obtención de esta proteína inmunogénica como un posible candidato para una subunidad de vacuna.

9. Conclusiones

Se logró detectar el virus de la fiebre aftosa serotipo O en las muestras de epitelio de lengua de ganado infectado donadas por el NIH mediante RT-PCR utilizando primers específicos para el serotipo O del virus.

Se estandarizó el PCR para la amplificación de los genes inmunogénicos del virus de la FA y se obtuvieron los genes VP1, P1-2A y 3C a partir de las muestras de ganado infectado que salieron positivas para el serotipo O.

A partir de la clonación del gen VP1 en el vector pFastBac, se logró realizar la transposición de éste en el Bacmid, logrando obtener un Bacmid recombinante con el gen VP1 del virus de la fiebre aftosa, confirmado mediante secuenciación.

So logró establecer un sistema Bac-to-Bac para el gen VP1 del virus de la FA con el fin de expresar, en estudios posteriores, la proteína en cultivo celular.

10. Recomendaciones

- Diseñar un nuevo primer forward para P1-2A que tenga un sitio de restricción diferente al de BamHI.
- Construir Bacmids recombinantes con los constructos P1-2A y P1-2A-3C
- Continuar el proyecto con el Bacmid recombinante con VP1, P1-2A y P1-2A-3C para la transfección en la línea celular sf9 y la posterior expresión de las proteínas de los diferentes constructos.
- Evaluar la inmunogenicidad de cada uno de los constructos y determinar cuál es el mejor candidato para una subunidad de vacuna.
- Realizar un estudio de prevalencia de serotipos en Ecuador para tener una idea más clara de qué serotipos son los que se encuentran con mayor frecuencia en el país.
- Realizar el mismo estudio pero con genes inmunogénicos para el serotipo A debido a que no existe inmunización general para todos los serotipos y éste es el segundo serotipo más frecuente en el Ecuador.

11. Bibliografía

Abbas, A. (2005). *Cellular and Molecular Immunology*. Elsevier Saunders. 5ta edición.

Capítulo 15. Immunity to Microbes.

Blast. (n.f.). *Frequently asked questions*.

http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastDocs&DOC_TYPE=FAQ#expect

Brown, F. (1986). *Review Lecture: Foot-And-Mouth Disease – One of the Remaining*

Great Plagues. Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. Vol 229. 215-226.

FAO. (2007). *Foot-and-Mouth Disease: Situation worldwide and major epidemiological events in 2005-2006*.

Grubman, Marvin. (2005). *Development of novel strategies to control foot-and-*

mouth disease: Marker vaccines and antivirals. Biologicals. Volumen 33. 227-234.

Hoy. (2009). *Aftosa dejaría este año más de \$25 millones en pérdidas*.

<http://www.hoy.com.ec/noticias-ecuador/aftosa-dejaria-este-ano-mas-de-25-millones-en-perdidas-353857.html>

Invitrogen. (2010). *Bac-to-bac Baculovirus Expression System*. Version F.

Invitrogen. (2007). *T4 DNA ligase*.

- Li, Z., Yi, Y., Yin, X., Zhang, Z., Liu, J (2008). *Expression of Foot-and-Mouth Disease Virus Capsid Proteins in Silkworm- Baculovirus Expression System and Its Utilization as a Subunit Vaccine*. Plos One. Volumen 3.
- Lin, J., Chen, T., Weng, K., Chan, S., Chen, L., Shih, S. (2009). *Viral and host proteins involved in picornavirus life cycle*. Journal of Biomedical Science. BioMed Central.
- Malirat, V y Bergmann, I. (2003). *Fiebre Aftosa: Instrumentos moleculares para caracterización viral*. Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.
- McPherson, M y Moller, S. (2010). *PCR: The Basics from background to bench*. Garland Science/BIOS Scientific Publishers.
- Ólafsdóttir, G., Vilhjálmur, S., Ingvarsson, S., Marti, E., Torsteinsdóttir, S. (2008). *In vitro analysis of expression vectors for DNA vaccination of horses: the effect of a Kozak sequence*.
- Omega-Bio-tek. (2009). *E.Z.N.A.® Total RNA Kit*.
- O'Reilly, D. (1999) *The Baculovirus EGT gene*. RIKEN Review. No 22. 17-19.
- Patterson, R., Selkirk, J., Merrick, B. (1995). *Baculovirus and Insect Cell Gene Expression: Review of Baculovirus Biotechnology*. Environmental Health Perspectives. Vol. 103. 756-759.

Plotkin, S., Orenstein, W., Offit, P. (2008). *Vaccines*. Elsevier Health Sciences. Capítulo

2. Vaccine immunology.

Prempeh, H., Smith, R., Muller, B. (2001). *Foot and mouth disease: the human*

consequences. BMJ. Vol 322. 565-566.

Promega. (2011). *Assembly of restriction enzyme digestion.*

Promega. (2010). *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System.*

Promega. (2007). *T4 DNA Ligase.*

Reddi, O. (2000). *Recombinant DNA Technology*. Capítulo 1. The basic of Recombinant

DNA.

Rodriguez, Luis y Marvin Grubman. (2009). *Foot and mouth disease virus vaccines.*

Vaccine, Vol 27. D90-D94.

Rohrmann, G. (2008). *Baculovirus Molecular Biology*. Capítulo 3. The baculovirus

replication cycle: Effects on cells and insects.

Sáiz, M., Nuñez, J., Jimenez-Clavero, M., Baranowski, E., Sobrino, F. (2002). *Foot*

and mouth disease virus: biology and prospects for disease control. INIA: Madrid,

España.

Strauss, J y Strauss, G. (2002). *Virus and Human Disease*. Plus-Strand RNA and Double-

Strand RNA Viruses. Capítulo 3. 57-122.

Van Oers, Monique. (2006). *Vaccines for viral and Parasitic Diseases Produced with*

Baculovirus Vectors. Advances in virus research. Vol 68. 193-253.

Laboratory of Virology, Wageningen, The Netherlands.

Vlak, J.M. de Gooijer, Tramper, J. Miltenburger, H.G. (1996). *Insect Cell Cultures:*

Fundamental and applied aspects. Construction of Baculovirus Recombinants. 111-123. Kluwer Academic Publishers.

Widgorovitz, A., Carrillo C., Santos, M., Trono, K., Peralta, A., Gómez, M., Ríos,

R., Franzone, P., Sadir, A., Escribano, J., Borca, M. (1999). *Induction of a Protective Antibody Response to Foot and Mouth Disease Virus in Mice Following Oral or Parenteral Immunization with Alfalfa Transgenic Plants Expressing the Viral Structural Protein VP1*. Virology. Volume 255. 347-353.

Xu, Y., Shen, H., Zhao M., Chen L., Li, Y. Liao, M., Lu Y., Chen, J. (2011).

Adenovirus-vectored shRNAs targeted to the highly conserved regions of VP1 and 2B in tandem inhibits replication of foot-and-mouth disease virus both in vitro and in vivo. Journal of Virological Methods.

12. Tablas

Tabla 1: Lista de muestras de epitelio de lengua utilizadas para la detección molecular del virus de la FA donadas por el INH del Ecuador.

Nombre de la muestra	Proveniencia	Serotipo O
80	Ecuador	Negativo
86	Ecuador	Positivo
98	Ecuador	Negativo
223	Ecuador	Negativo
226	Ecuador	Positivo

Tabla 2: Primers utilizados para la detección molecular del virus de la FA. Las secuencias fueron obtenidas del Manual de Fiebre Aftosa: Instrumentos moleculares para caracterización viral del 2003 elaborado por Malirat y Bergmann

Primer	Secuencia del primer	Tamaño del amplicón	Temperatura de annealing
Fa-O-F (Forward)	ACCAACCTCCTTGATGTGGCT	1301 pb	60°C
Fa-S-R (Reverse)	GACATGTCCTCCTGCATCTG	1301 pb	60°C

Tabla 3: Primers diseñados para la amplificación de los genes de la cápside del virus de la FA.

Primer	Secuencia del primer	Tamaño del amplicón	Temperatura de annealing
VP1 (Forward)	ata <u>GGATCC</u> <i>acc</i> ATGAACCACTTCTGCGGGCGAGT	642 pb	60°C-55°C
Esquema del primer	Nucleótidos extra - Sitio de restricción BamHI - Kozak - Codón de inicio - VP1		
VP1 (Reverse)	cgc <u>AAGCTTTTAAAGTCTGTTT</u> CACCGGTGCCAC	642 pb	60°C-55°C
Esquema del primer	Nucleótidos extra - Sitio de restricción HinDIII – Codón de fin- VP1		
P1-2A (Forward)	ata <u>GGATCC</u> <i>acc</i> ATGGGACAATCCAGTCCAGCGACCG	2250 pb	67°C-65°C
Esquema del primer	Nucleótidos extra - Sitio de restricción BamHI- Kozak – Codón de inicio – P1-2A		
P1-2A (Reverse)	cgc <u>GAATTCTTACCCAGGGTTGGACTCAACGTCT</u>	2250 pb	67°C-65°C
Esquema del primer	Nucleótidos extra - Sitio de restricción EcoRI – Codón de fin – P1-2A		
3C (Forward)	ata <u>GAATTC</u> ACCATGAGTGGTGCCCCACCGACCG	640 pb	60°C-55°C
Esquema del primer	Nucleótidos extra Sitio de restricción EcoRI – Kozak – Codón de inicio – 3C		
3C (Reverse)	cgc <u>AAGCTTTTATCGTGGTGTGGTTCGGGGTC</u>	640 pb	60°C-55°C
Esquema del primer	Nucleótidos extra - Sitio de restricción HinDIII – Codón de fin		

13. Figuras

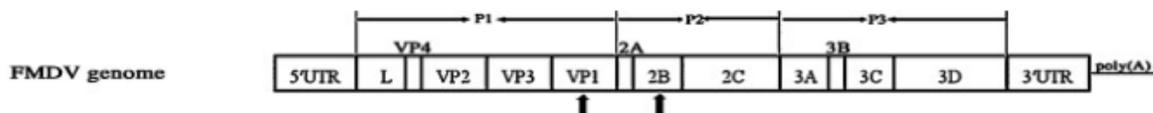


Figura 1: Esquema del genoma del virus de la FA. En esta figura se puede observar el genoma del virus de la Fiebre Aftosa junto con los genes P1 que darán como resultado la cápside del virus (Xu, 2010). Donde P1 contiene los genes estructurales del virus y P2 y P3 contienen los genes no estructurales (Strauss y Strauss, 2002)

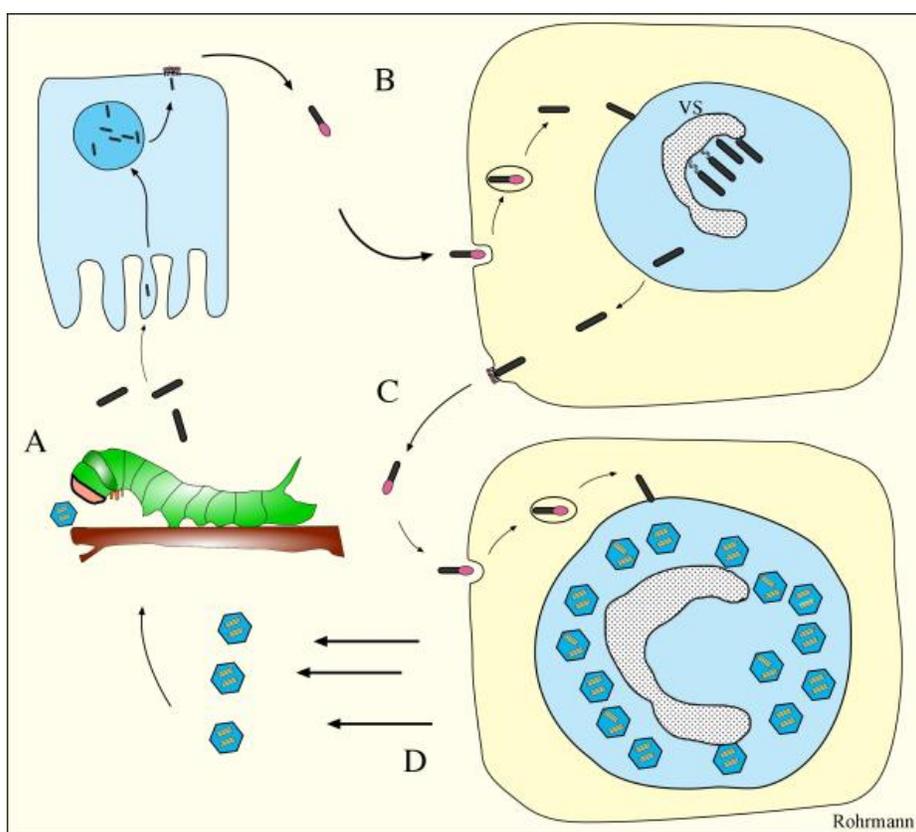


Figura 2: Ciclo de infección de los Baculovirus. (A) Los virus en su forma ocluida son comidos por el insecto y sus cuerpos de oclusión son disueltos en el intestino medio. Los virus derivados de la oclusión son liberados e infectan las células epiteliales. (B) Los viriones salen de la célula en forma de virus brotados e inician la infección sistémica. (C) En la infección tardía se producen los viriones ocluidos, la célula muere liberando los cuerpos de oclusión. (D) El virus ocluido es liberado al ambiente (Rohrmann, 2008).

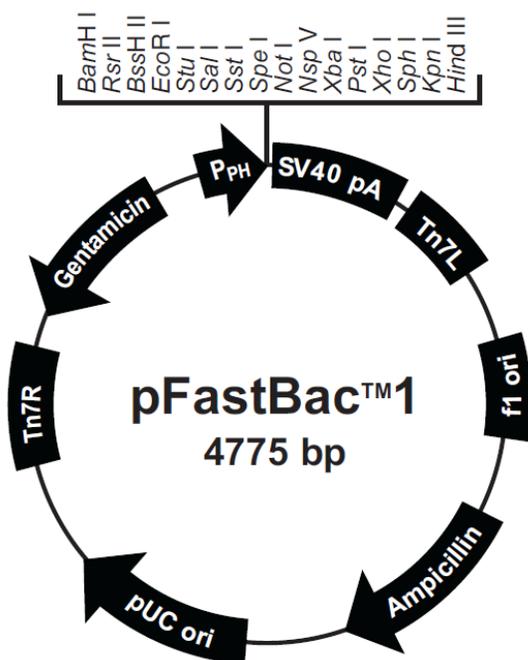


Figura 3: Esquema del vector pFastBac usado para este estudio. Contiene un sitio de clonación múltiple, gen de resistencia a la ampicilina y a la gentamicina, el promotor de la proteína polihedrina (P_{ph}) y sitios Tn7R y Tn7L para la transposición en el Bacmid. (Invitrogen, 2010).

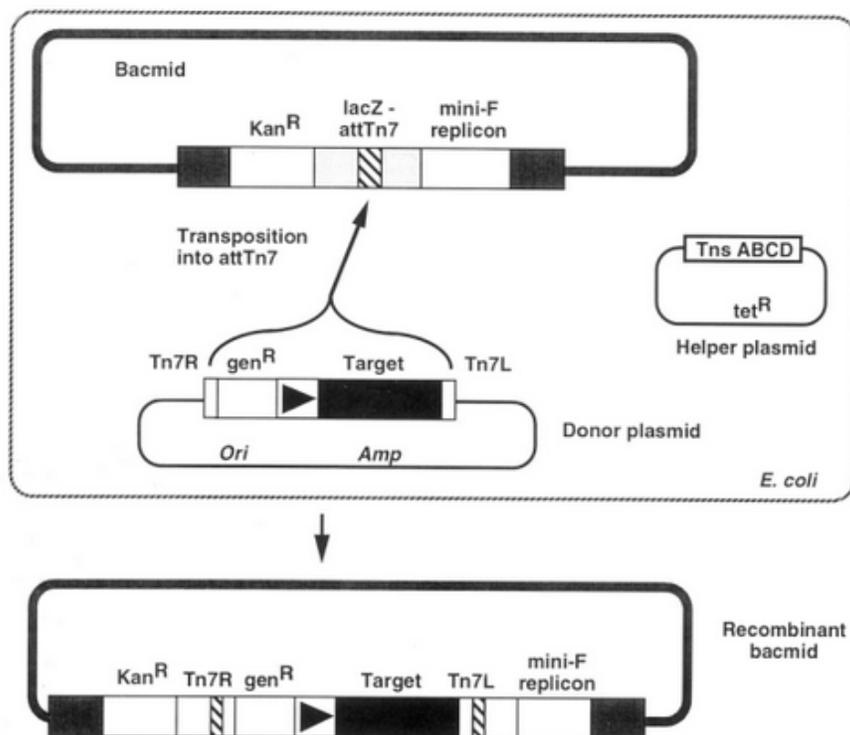


Figura 4: Esquema de la transposición del plásmido donador (pFastBac) al Bacmid. Se puede observar cómo la región mini Tn7 del pFastBac (flanqueado por Tn7R y Tn7L) entra a la región mini attTn7 interrumpiendo el gen LacZ con la ayuda del Helper Plasmid (Vlak et al., 1999).

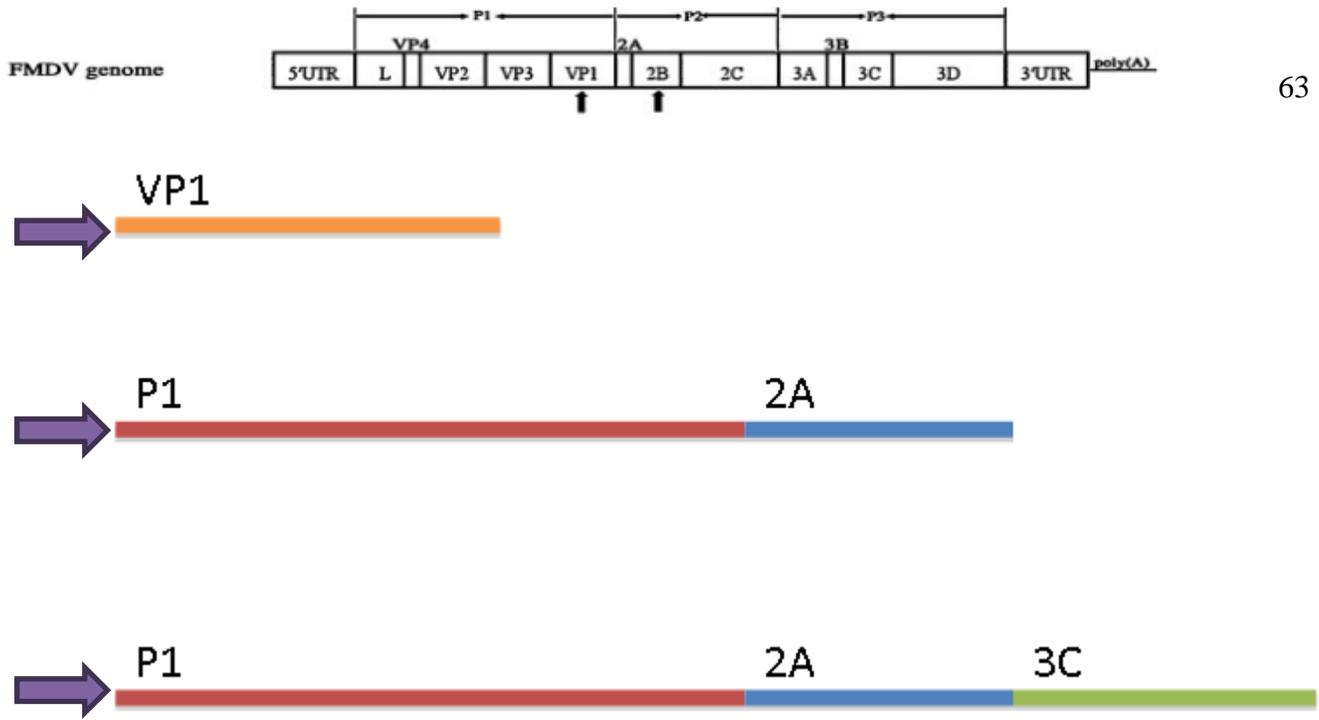


Figura 5: Esquema de constructos que se utilizaron en este proyecto. VP1, P1-2A y P1-2A-3C (Xu, 2010; Li et al., 2008; Saiz et al., 2002).

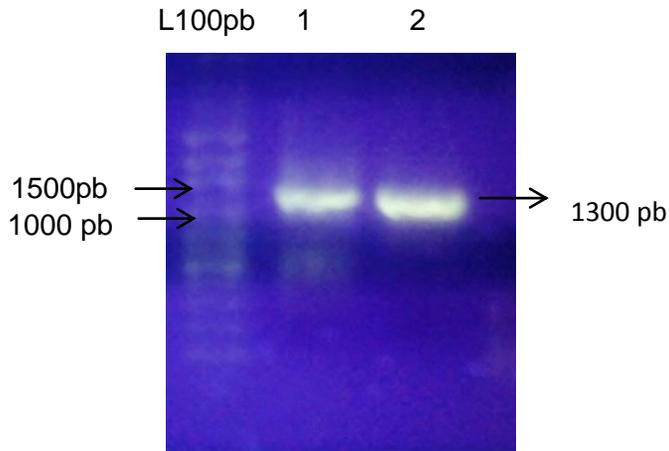


Figura 6: Amplificación del ADN serotipo O de Fiebre Aftosa de muestras de epitelio de ganado vacuno. L: escalera marca Axygen de 100 pb. (1) amplificación de la muestra 226 (2) Amplificación de la muestra 86.

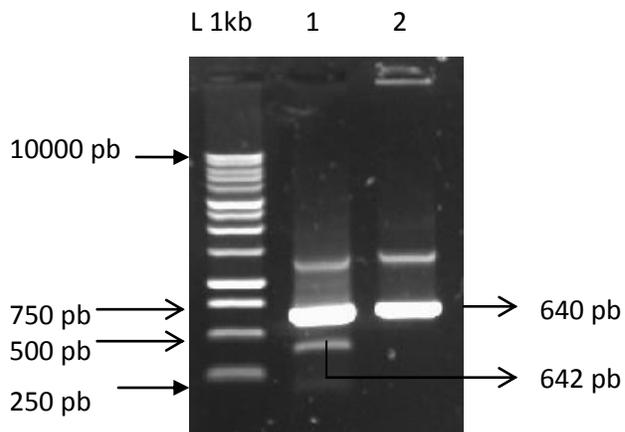


Figura 7: Amplificación de los genes de la cápside de la FA. L 1kb) Escalera de 1kb marca promega. 1) Amplificación para el gen VP1 del virus de la FA. 2) Amplificación para el gen 3C del virus de la FA.

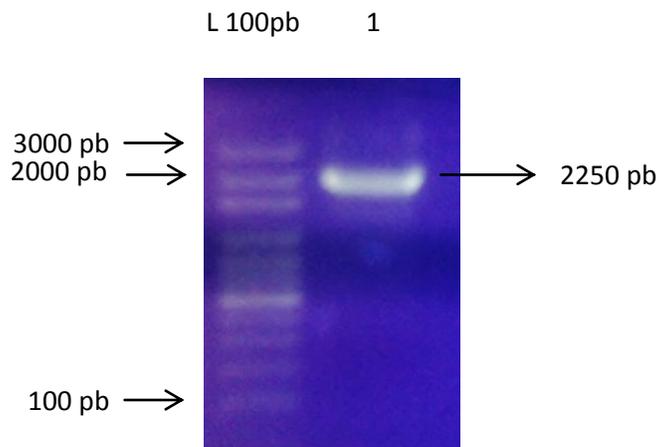


Figura 8: Amplificación del gen de la cápside de la FA. L100pb) escalera de axygen de 100 pb hasta 3000 pb. 1) Amplificación del conjunto de genes P1-2A

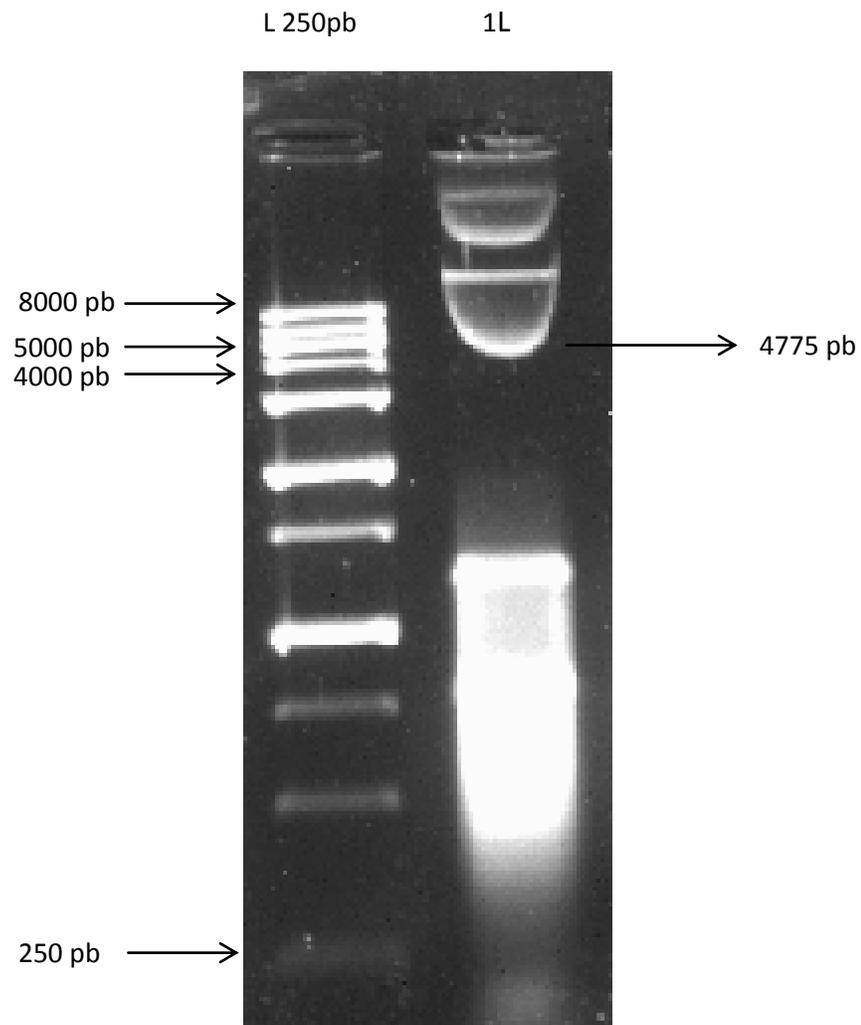


Figura 9: Extracción de plásmido pFastBac. L 250pb) Escalera marca axygen de 250 pb hasta 8000 pb. (1) Plásmido pFastBac a la altura de 4775 pb.

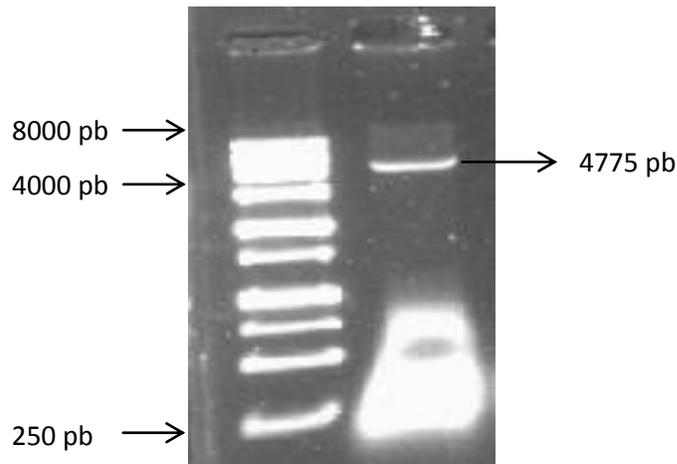


Figura 10: Plásmido linearizado con enzimas de restricción. L 250pb) Escalera marca axygen de 250 pb 1) Plásmido linearizado después de haber sido cortado con enzimas de restricción.

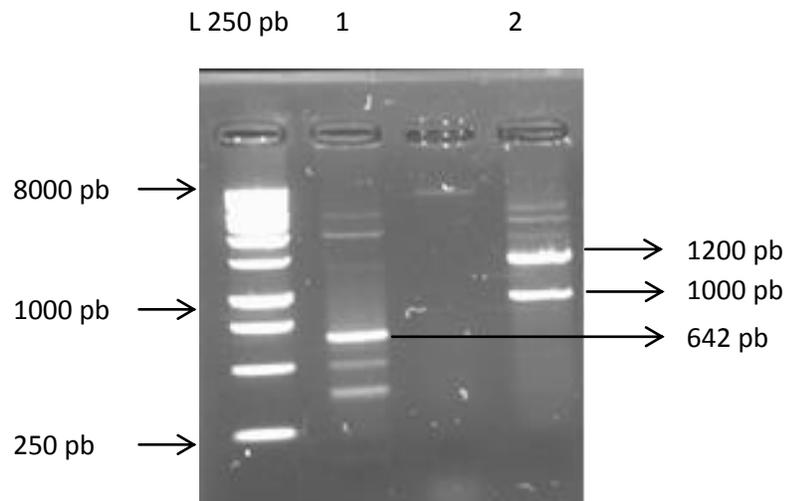


Figura 11: Restricción enzimática del gen VP1 y del conjunto de genes P1-2A. L 250pb) Escalera de 250 pb a 8000 pb de axygen. 1) Restricción enzimática del gen VP1. 2) Restricción enzimática del conjunto de genes P1-2A donde se observa que el gen fue cortado en la mitad.

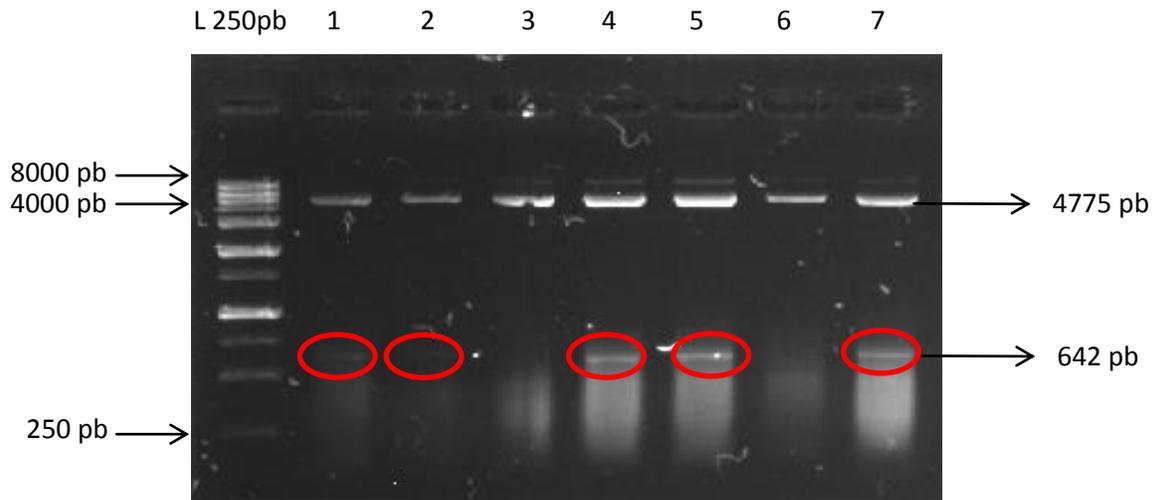


Figura 12: Restricción enzimática del plásmido pFastBac con BamHI y HinDIII para determinar la presencia del gen VP1 dentro del vector. L 250pb) Escalera marca axygen de 250 pb. 1 – 7 restricciones enzimáticas a partir de plásmidos extraídos de colonias que crecieron después de la transformación bacteriana con VP1. 1, 2, 4, 5 y 7 resultaron ser positivas para el gen VP1.

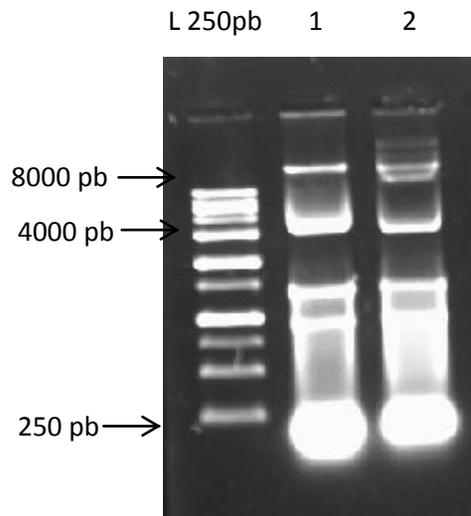


Figura 13: Figura comparativa de pFastBac-VP1 y pFastBac sin inserto. L 250 pb) Ladder marca axygen de 250 pb. 1) extracción de plásmido pFastBac-VP1. 2) Extracción de plásmido pFastBac sin inserto.

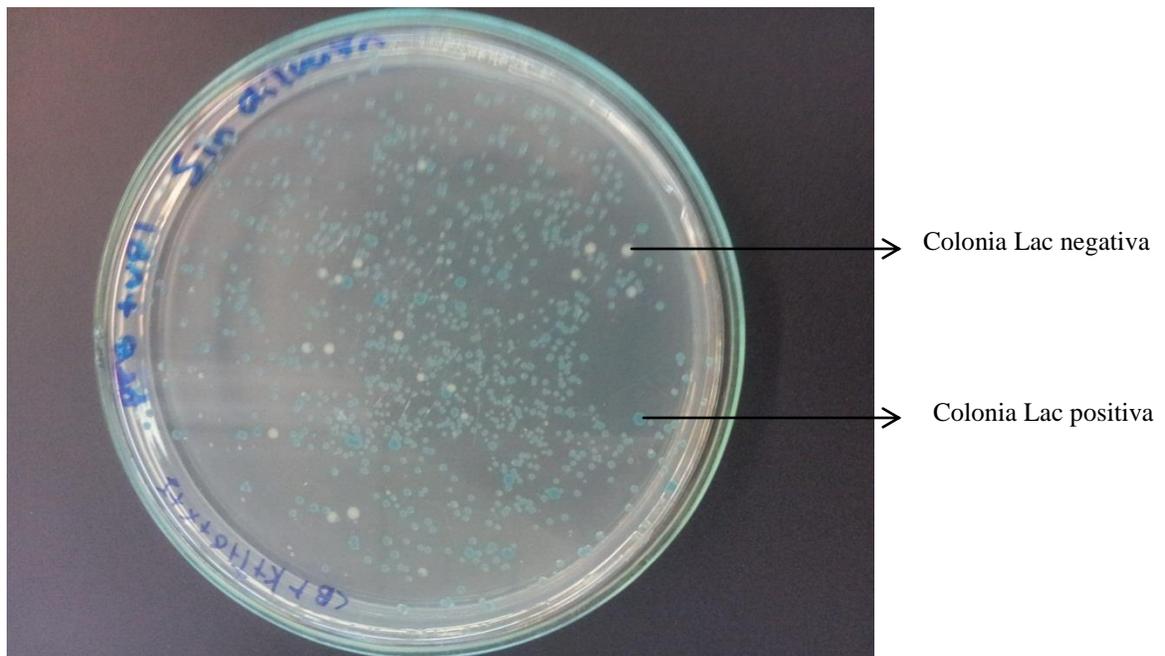


Figura 14: Crecimiento de colonias después de la transposición. Medio LB sólido suplementado con tetraciclina, gentamicina, kanamicina, X-GAL e IPTG en donde se observan varias colonias Lac negativas. De estas colonias se escogieron 5 al azar para realizar un screening con PCR y determinar cuáles poseían un Bacmid recombinante con el gen VP1.

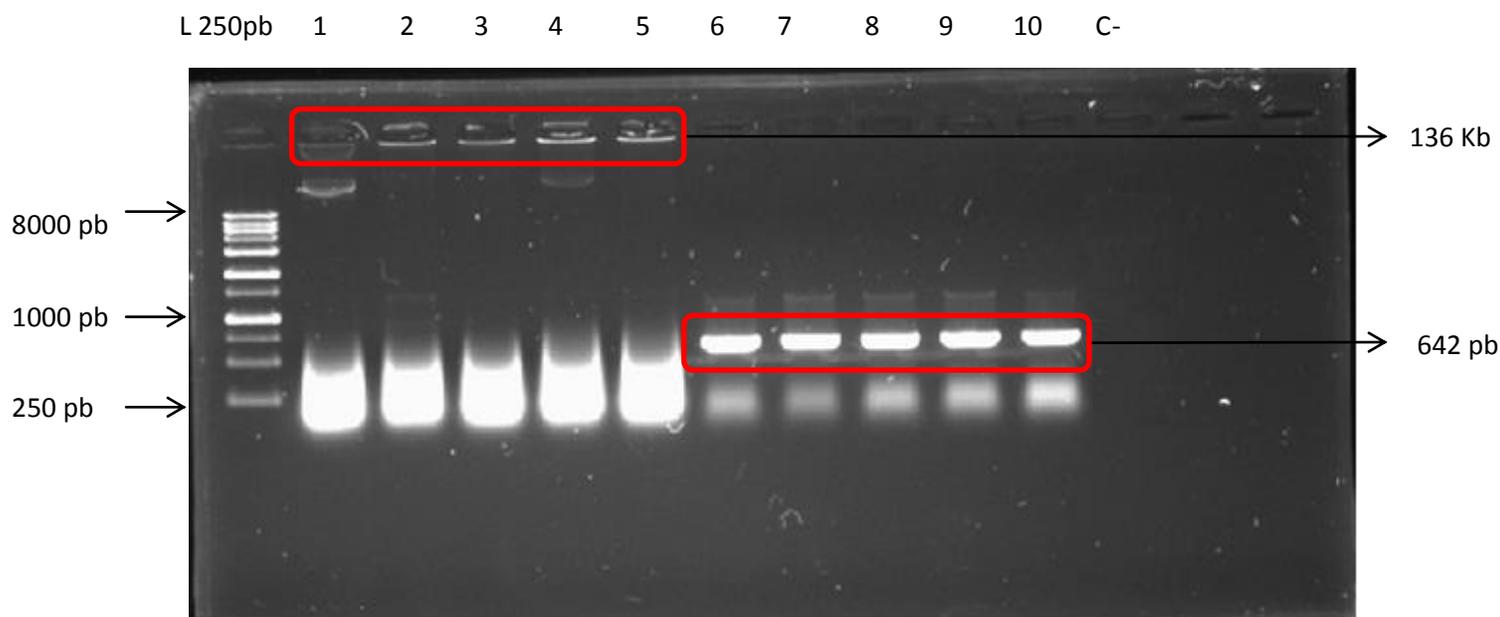


Figura 15: Extracción de Bacmid y PCR del Bacmid para comprobar la presencia del gen VP1. L 250 pb) Ladder marca Axygen de 250 pb – 8000 pb. 1-5) extracciones de Bacmid donde se puede observar la banda en la parte superior al gel correspondiente a 136 Kb. 6-10) PCR del Bacmid para determinar la presencia del gen VP1, se puede observar la banda correspondiente al gen VP1 de 642 pb. C-) Control negativo del PCR en donde se utilizó agua de PCR en lugar de ADN en el mix de reacción.

14. Anexos

Anexo 1: Fórmula utilizada para calcular la cantidad de inserto que se utilizó en la ligación.

$$\frac{ng \text{ de vector} \times \text{Tamaño de inserto (pb)}}{\text{Tamaño de vector (pb)}} \times \text{radio molar de } \frac{\text{Inserto}}{\text{Vector}} = ng \text{ de inserto}$$

(Promega, 2007)

Anexo 2: Fórmula utilizada para calcular la cantidad de inserto para VP1.

$$\frac{50 \text{ ng de pFastBac} \times 642 \text{ pb de VP1}}{4775 \text{ pb de pFastBac}} \times \frac{5}{1} = 33.61 \text{ ng}$$

(Promega, 2007)

Anexo 3: Fórmula utilizada para calcular la cantidad de inserto para P1-2A

$$\frac{50 \text{ ng de pFastBac} \times 2250 \text{ pb de P1-2A}}{4775 \text{ pb de pFastBac}} \times \frac{5}{1} = 117.80 \text{ ng}$$

(Promega, 2007)

Anexo 4: Secuencia obtenida después de la secuenciación del plásmido pFastBac-VP1.

```
ATGGACGGACTGTGAAAGGGACCCCGCACTTTCGAACCAGTGTTTTAGACCTCATGCTC
ATTCCATCACTCACTTTGGTGGGAGCACTCCTGCGCGCGTCCCCTTACTACTTCTCGGA
CCTGGAGATAGCAGTAAAACATGAGGGAGACCTCCCCTGGGTCCCAAATGGAGCACCT
GAAACGGCGCTGGACAACACCACCAACCCAAGTCTTACTACAAGGCGCCACTCAACC
GGCTTGCCCTGCCCTACACCGCGCCTCACCGCGTGTTGGCAACCGTGTACAACGGTGA
GTGCAAGTACGGGAGAACAGCCGCGCCAAAAGAGGTGACTTACAGGTGCTGGCTCA
AAGAGTAGCTCGGACACTGCCCACTTCCCTTCATCTACGGTGAATCAAAGCAACTCAC
GTCCTGAAGTCTTTACCGGATGAAGAGGGCTGAAACATACTGTCCAAGACCACTGC
TAGGGATCCAACCAACGGACCCTAGGCACAAACAGAAGATTGTGGCACCGGTGAAAC
AGACTTTAAAAGCTTGTGCGAGAAGTACTAGAGGATCATAATCAGCCATACCACATTTG
TAGAGGTTTTACTTGCTTTAAAAAACTCCCACACCTCCCCCTGAACCTGAAACATAAA
ATGAAATGCCATTGTTGTTGGGAATTGTTTATTGCCCTTATAATGGTTA
```