

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA**



**INSTITUTO CLODOMIRO PICADO (UCR)
ICP**

**SERINA PROTEASAS DE *Lachesis stenophrys* y *Bothrops asper*:
PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE INMUNIZACIÓN CON
ADN Y SUBCLONAJE**

**Informe presentado a la Escuela de Biología del
Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial
para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología**

MARVIN MADRIGAL VILLALOBOS

CARTAGO, 2006

SERINA PROTEASAS DE *Lachesis stenophrys* Y *Bothrops asper*: PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS MEDIANTE INMUNIZACIÓN CON ADN Y SUBCLONAJE

Marvin Madrigal Villalobos*

RESUMEN

El veneno de vipéridos contiene componentes tóxicos de naturaleza enzimática, dentro de los cuales se destacan serina proteasas por su contribución a provocar un desbalance del sistema hemostático. La baja proporción de anticuerpos específicos para neutralizar toxinas de interés dentro de los sueros antiofídicos producidos de forma convencional, ha llevado a la obtención de los ADNc codificantes para diversas toxinas y su clonación en vectores de expresión, con el fin de producir anticuerpos específicos mediante inmunización con ADN. En esta investigación, se inmunizaron ratones vía intravenosa con el ADNc codificante para una serina proteasa del veneno de *Lachesis stenophrys* clonado en el plásmido pCl, y se realizó un subclonaje de una serina proteasa del veneno de *Bothrops asper* en el vector de expresión eucariota: pVAX1-UbC. Tras determinar el nivel de IgGs específicas para la serina proteasa de *L. stenophrys* en el suero de ratones inmunizados, se determinó la ausencia de una respuesta inmune específica mediante inmunización intravenosa, lo cual evidencia la necesidad de buscar nuevas estrategias para optimizar los constructos de ADN a ser utilizados. El subclonaje realizado constituye una de ellas, con el fin de estudiar a futuro el efecto regulador de un promotor muy conservado en mamíferos (el gen de la Ubiquitina C) sobre la expresión de la serina proteasa de *B. asper*.

Palabras clave: Serina proteasas, inmunización con ADN, promotor, administración intravenosa, antivenenos terapéuticos.

* INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2006.

ABSTRACT

Snake bites are a relatively common cause of accidental envenoming in humans and intravenous administration of heterologous antivenoms is the only effective treatment for systemic snakebite envenomings. These antivenoms are conventionally produced by fractionation of plasma from large animals, usually horses, hyperimmunized with a single crude venom or a mixture of venoms from different species. However, each venom is a highly diverse mixture of proteins, and only some venom proteins are responsible for the toxic effects of the venom. Therefore, the therapeutic value of antivenoms would theoretically be enhanced by restricting antibody specificity to toxic venom proteins.

Immunization of animals with DNA encoding mutated versions or fragments of toxic proteins from bacteria induces a strong antibody response, which fully protects from the toxic effects of the native proteins. More recently, immunization with a plasmid encoding a fragment of a snake venom hemorrhagic toxin was shown to elicit the production of antibodies which effectively neutralize the holotoxin. Thus, the application of DNA immunization to the production of therapeutic antivenoms has the potential to provide a more cost-effective, less hazardous and more specific therapy than those currently used to treat envenoming by snake bites.

Serine proteases are important components of pit viper venoms which contribute to cause an imbalance of the haemostatic system during snakebite envenomings. The aim of this work was to develop a DNA immunization strategy for antivenom production using full cDNAs encoding serine proteases from *Bothrops asper* and *Lachesis stenophrys*. Mice were immunized by intravenous injection with the cDNA encoding a snake venom serine protease from *Lachesis stenophrys* cloned in the plasmid vector pCI. No specific immune response was detected in the immunized animals, measuring the IgG levels against the serine protease by an ELISA. Looking for a new strategy to optimize the DNA constructs for immunization protocols, a snake venom serine protease of *Bothrops asper* was subcloned in the eukaryotic expression vector pVAX1-UbC. This subcloning will allow the study of the regulatory effect of a highly conserved promoter among mammals (the ubiquitin C gene) on the expression of the serine protease from *B. asper*.

Keywords: Serine proteases, DNA immunization, promoter, intravenous delivery, therapeutic antivenom.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE TABLAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
LISTA DE ABREVIACIONES	ix
CAPÍTULO 1	
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2	
REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1 Ofidismo en Costa Rica	3
2.2 Accidente y envenenamiento ofídico	8
2.3 Componentes tóxicos de venenos de ofidios	10
2.3.1 Serina Proteasas	
2.4 Inmunización con ADN	12
2.4.1 Diseño de plásmidos	14
2.4.2 Respuesta inmune mediada por plásmidos recombinantes	16
2.4.3 Desarrollo de anticuerpos específicos	19

CAPÍTULO 3	
OBJETIVOS	22
CAPÍTULO 4	
MATERIALES Y MÉTODOS	23
4.1 Preparaciones de pCI-SP (<i>L. stenophrys</i>) y pCI	23
4.2 Inmunización de ratones controles	25
4.3 Inmunización de ratones con pCI-SP (<i>L. stenophrys</i>) y pCI	26
4.4 Extracciones de suero murino	29
4.5 Evaluación de la respuesta inmune por ELISA	30
4.6 Subclonaje de serina proteasa de <i>B. asper</i> en pVAX1	32
CAPÍTULO 5	
RESULTADOS	36
5.1 Preparaciones de pCI-SP (<i>L. stenophrys</i>) y pCI	36
5.2 Inmunización de ratones controles	37
5.3 Inmunización de ratones con pCI y pCI-SP (<i>L. stenophrys</i>)	39
5.4 Subclonaje de serina proteasa de <i>B. asper</i> en pVAX1	41
CAPÍTULO 6	
DISCUSIÓN	45
CAPÍTULO 7	
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	57
ANEXOS	65

ÍNDICE DE TABLAS

- 4.1** Esquemas de inmunización de ratones CD-1 con veneno completo de *Bothrops asper* del Pacífico y *Lachesis stenophrys*. **26**
- 4.2** Esquemas de inmunización de ratones CD-1 con el plásmido recombinante pCI-SP (*L. stenophrys*) y con el plásmido control pCI. **28**

ÍNDICE DE FIGURAS

2.1	Distribución geográfica de las serpientes <i>Lachesis stenophrys</i> y <i>Bothrops asper</i> en Costa Rica.	7
4.1	Mapa del vector de expresión pCI.	24
4.2	Mapa del vector de expresión pVAX1.	33
5.1	Comprobación de la pureza del ADN correspondiente a las maxipreparaciones de pCI y pCI-SP (<i>L. stenophrys</i>).	36
5.2	Determinación del nivel de anticuerpos generados en ratones controles inmunizados con veneno completo de <i>Bothrops asper</i> y <i>Lachesis stenophrys</i> por un período de 40 días.	38
5.3	Determinación del nivel de anticuerpos generados en ratones inmunizados con el plásmido recombinante pCI-SP que contiene el ADNc que codifica para una serina proteasa de <i>Lachesis stenophrys</i> por un período de 80 días.	40
5.4	Determinación del tamaño aproximado en pares de bases de los plásmidos pVAX1-Ubc-GFPuv y pCI-SP (<i>B. asper</i>).	41
5.5	Comparación del tamaño aproximado en pares de bases del ADNc codificante para la serina proteasa de <i>Bothrops asper</i> .	42

- 5.6** Comparación entre el plásmido pVAX1-UbC-GFPuv y el vector resultante del tratamiento con las enzimas EcoRI + Hind III (pvAX1.1). **43**
- 5.7** Análisis de restricción con las enzimas Acc I + Hind III para comprobar la orientación de serian proteasa de *Bothrops asper* en el vector pVAX1.1. **44**

ÍNDICE DE ANEXOS

1. Secuencia completa de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de una serina proteasa del veneno de *Bothrops asper*. 67
2. Secuencia completa de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de una serina proteasa del veneno de *Lachesis stenophrys*. 69

LISTA DE ABREVIACIONES

- a.a:** Aminoácidos.
- ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- ADNc:** ADN copia.
- APC:** Células presentadoras de antígenos.
- ARN:** Ácido ribonucleico.
- ARNm:** ARN mensajero.
- ARNt:** ARN de transferencia.
- ATP:** Adenosín trifosfato.
- BGH:** Hormona de crecimiento bovina.
- CIP:** Fosfatasa Alcalina del Intestino de Ternero.
- CMV:** Citomegalovirus.
- CTL:** Linfocitos T Citotóxicos.
- DL₅₀:** Dosis letal media.
- dNTPs:** Desoxirribonucleótidos trifosfato.
- ELISA:** Ensayo de inmunoabsorción ligado a una enzima.
- Fc:** Fragmento cristalizable.
- FLT-3L:** Ligando 3 tirosina kinasa similar a FMS.
- GFPuv:** Proteína verde fluorescente.
- GM-CSF:** Factor estimulador de colonias de macrófagos y granulocitos.
- HLV:** Distribución hidrodinámica por la vena de la extremidad.
- HTV:** Distribución hidrodinámica por la vena de la cola.
- IgG:** Inmunoglobulina.
- ISS:** Secuencias inmunoestimuladoras.
- LB:** Medio de cultivo Luria-Bertani.
- MHC:** Complejo Mayor de Histocompatibilidad.
- NK:** Células asesinas naturales.
- PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa.
- SP:** Serina proteasa.
- SV40:** Virus 40 del simio.
- SVSP:** Serina proteasas del veneno de serpientes.

Th: Linfocitos T cooperadores.

UbC: Ubiquitina C.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El envenenamiento por mordeduras de serpientes representa un problema de interés mundial, especialmente para aquellos países con una alta incidencia en este tipo de accidentes, como es el caso de Costa Rica. La mortalidad debida a mordeduras de ofidios se ha estimado en 50000 muertes anuales en el mundo (Warrel, 1996). En Centroamérica, los principales casos de mordeduras se adjudican a serpientes de la familia Viperidae (subfamilia Crotalinae), donde las especies *Bothrops asper* y *Lachesis stenophrys* demandan especial interés desde el punto de vista médico.

Como parte del tratamiento para combatir los efectos de las secreciones tóxicas de los ofidios, se han empleado sueros antiofídicos, los cuales son producidos a partir del fraccionamiento del plasma de animales inmunizados como caballos y ovejas. La producción de estos sueros, tradicionalmente ha seguido un esquema que incluye inoculaciones sucesivas, por algunos meses, de dosis incrementadas de venenos simples o mezclas de venenos, según se requiera producir sueros monoespecíficos o poliespecíficos respectivamente.

Los venenos de serpientes constituyen mezclas complejas de proteínas, siendo sólo un porcentaje de éstas tóxicas; por consiguiente, los sueros antiofídicos convencionales poseen una gran cantidad de anticuerpos que en su mayoría no corresponden a los componentes antigénicos tóxicos. Como consecuencia, la respuesta específica contra las toxinas involucradas en las principales lesiones se torna muchas veces ineficiente, ya sea por el efecto inmunodominante de aquellas proteínas no tóxicas, o bien, por la actividad inhibitoria de la respuesta inmune por parte de otras proteínas. Esto se refleja, por lo general, en el empleo de gran cantidad de suero antiofídico por paciente durante el tratamiento clínico de las mordeduras.

Ante la dificultad de obtener toxinas puras del veneno completo de serpientes, y así, producir antivenenos más específicos contra las toxinas de interés, se ha planteado la utilización de esquemas de inmunización con constructos de ácido desoxirribonucleico (ADN), que corresponden a un vector, por lo general de tipo bacteriano, conteniendo en su sitio de clonación múltiple, la secuencia de nucleótidos (gen) que codifica para una toxina de interés, esto en presencia de un promotor eucariota adecuado.

De esta manera, se permite la expresión de proteínas específicas que actúan como antígenos en células de mamíferos, dirigiendo esto la producción igualmente específica de inmunoglobulinas (IgGs), que permitirían la preparación de sueros antiofídicos de alta especificidad, eficiencia y con menos efectos secundarios en los pacientes tratados por accidentes con serpientes.

Como parte de la intención por mejorar los sueros antiofídicos tradicionales, se ha puesto interés en producir anticuerpos contra serina proteasas (una clase de proteínas con efectos tóxicos, especialmente sobre la cascada de coagulación) en dos especies de ofidios de la familia Viperidae: *Lachesis stenophrys* (serpiente “matabuey”) y *Bothrops asper* (serpiente “terciopelo” o “barba amarilla”), esto mediante la técnica de inmunización con ADN.

CAPÍTULO 2

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Ofidismo en Costa Rica

A nivel mundial se conocen alrededor de 3000 especies de serpientes u ofidios, de las cuales se estima la presencia de 135 de ellas en Costa Rica, distribuidas a lo largo de diferentes hábitats (Gutiérrez, 1995; Chávez *et al.*, 2000; Gold *et al.*, 2002). En la región centroamericana las serpientes con capacidad para producir secreciones tóxicas se hallan clasificadas en tres familias: Colubridae, Elapidae y Viperidae.

Dentro de la familia Colubridae se encuentran especies con poca relevancia en envenenamientos en humanos, disponiendo sólo de algunos reportes de mordeduras con algún grado de envenenamiento por *Conopsis lineatus* (“guarda camino”). Por su parte, la familia Elapidae comprende, para el caso de Centroamérica, la subfamilia Hydrophiinae con sólo una especie conocida: *Pelamis platurus* o “serpiente de mar”, que ha sido encontrada únicamente en el Océano Pacífico; y la subfamilia Elapinae con 14 especies de serpientes coral (*Micrurus* sp.), las cuales son de tamaño pequeño, y no solamente se presentan en los bosques, sino que también en áreas urbanas. Las serpientes coral venenosas de Centroamérica se pueden distinguir de aquellas no venenosas (“falsas corales”) a través de un patrón morfológico de secuencia de colores de anillos completos ventral y transversalmente: rojo-amarillo-negro-amarillo-rojo, con las excepciones de *M. mipartitus* (“gargantilla”) y *M. dissoleucus* (Gutiérrez, 1995).

La familia Viperidae (subfamilia Crotalinae) con 16 especies dentro de la región centroamericana, es la responsable de los principales accidentes ofídicos y de la mayor cantidad de muertes. En Centroamérica, los vipéridos o “tobobas” se encuentran en una variedad de condiciones ecológicas y los especímenes están clasificados en los géneros *Bothrops* (actualmente dividido en tres géneros: *Bothrops*, *Bothriechis* y *Porthidium*), *Crotalus*, *Lachesis* y *Agkistrodon* (Campell y Lamar, 1989; Gutiérrez, 1995). Al igual que con las serpientes coral, se ha determinado un patrón para distinguir vipéridos venenosos, el cual está basado en características de la cabeza del ofidio que incluyen forma triangular, presencia de pupila vertical (elíptica) y cuatro fosetas: dos nasales y dos loreales (Chávez *et al.*, 2000).

El género *Bothrops* se encuentra representado principalmente en la región de América del Sur con 32 especies, mientras que en México y América Central sólo por una especie. Miembros de este género incluyen algunas de las serpientes venenosas más peligrosas del trópico americano debido a su agresividad, rapidez, largos colmillos y grandes volúmenes de veneno que pueden inyectar. Dentro de este género, se destaca la especie *Bothrops asper* (la causa más frecuente de accidentes en Centroamérica) que se distribuye desde tierras bajas y zonas premontanas en la vertiente Atlántica de Tamaulipas (México) hasta Colombia; y de la vertiente Pacífica de Costa Rica hacia el oeste de Ecuador, con una población separada en el sur de Chiapas (México) y en la vertiente Pacífica de Guatemala: 1- 1200 m (Savage, 2002).

En Costa Rica, *B. asper* se halla comúnmente en las tierras bajas y bosques húmedos, y es abundante en plantaciones bananeras y en otros ambientes modificados por el ser humano donde poblaciones de ratas han emergido (Ver figura 2.1). Esta serpiente es de gran tamaño (puede alcanzar un tamaño máximo de 2.5 m) y se le distingue de otros vipéridos por tener manchas oscuras laterales triangulares (lateral basal, dorsal apical) delineadas ligeramente, que usualmente se fusionan hacia el dorso para formar figuras de “mariposa”. La biología de esta especie se caracteriza por ser de tipo terrestre y de acción nocturna; no obstante, los especímenes juveniles son encontrados a menudo en árboles bajos y arbustos, presentando además una alimentación diurna que incluye ranas, lagartos, y artrópodos. Mientras tanto, en su estado adulto se alimentan primordialmente de pequeños mamíferos como roedores y zarigüeyas (Savage, 2002). Estudios realizados en relación con su veneno (Aragón y Gubensek, 1981) y su biología reproductiva (Solórzano y Cerdas, 1989), han determinado marcadas diferencias entre las poblaciones de *B. asper* en el Atlántico y Pacífico de nuestro país.

Por otro lado, el género *Lachesis* se halla comprendido por tres especies ovíparas, a diferencia de todos los demás vipéridos americanos. Este género se le puede encontrar en las tierras bajas desde el este de Nicaragua en la vertiente Atlántica hasta Bolivia y el sureste de Brasil, y en la vertiente del Pacífico en el suroeste de Costa Rica hasta el oeste de Ecuador, pero existen separaciones importantes en Panamá, gran parte de Venezuela y en el noreste y parte central de Brasil (Savage, 2002).

En Costa Rica, las especies del género *Lachesis* corresponden a *L. melanocephala* y *L. stenophrys*. Ésta última especie se distingue por tener una cabeza algo amplia y despuntada que carece de manchas oscuras, una franja oscura post-ocular distinta y la punta de la cola cubierta por encima y debajo por pequeñas escamas, terminando en una larga y punteada espina. Además, el patrón de color dorsal es característico en presentar diamantes largos oscuros (a menudo centrados ligeramente) a lo largo de la línea media con extremos laterales punteados ventralmente y usualmente continuando hacia abajo como líneas oscuras, y las manchas anterior-laterales formando barras laterales. Este ofidio figura entre los más grandes de América, pudiendo alcanzar hasta 3,9 m. Su distribución se establece principalmente en tierras bajas y bosques húmedos no alterados de la vertiente Atlántica (Ver figura 2.1). Se caracteriza además por tener un hábito nocturno relativamente terrestre, alimentarse principalmente de roedores pequeños y tener poca actividad de movimiento después de alimentarse (Savage, 2002). Por mucho tiempo, a esta especie se la ha comparado con la especie suramericana *Lachesis muta*, pero a través de estudios morfológicos y bioquímicos se ha logrado distinguir de las especies *L. melanocephala* y *L. muta* (Zamudio y Greene, 1997).

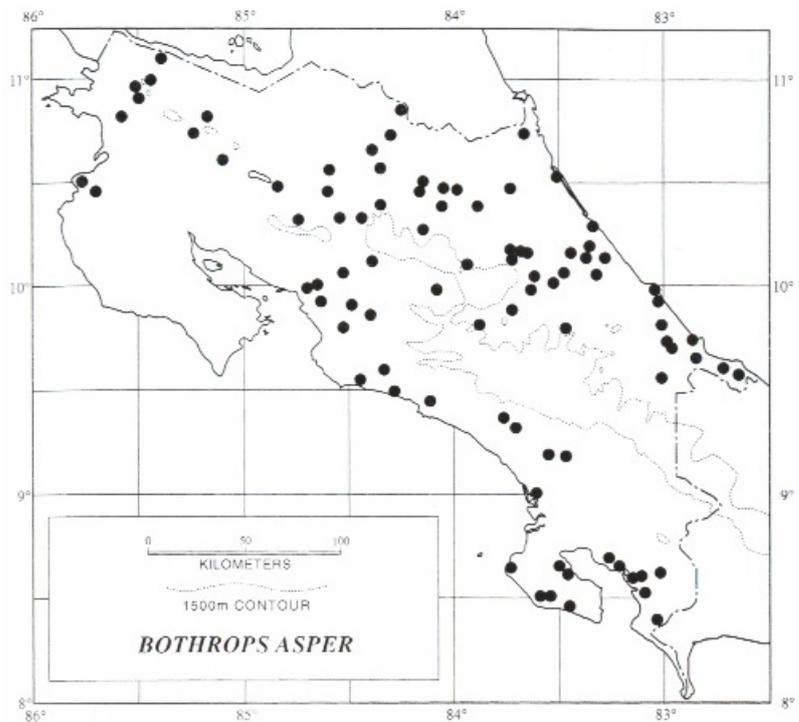
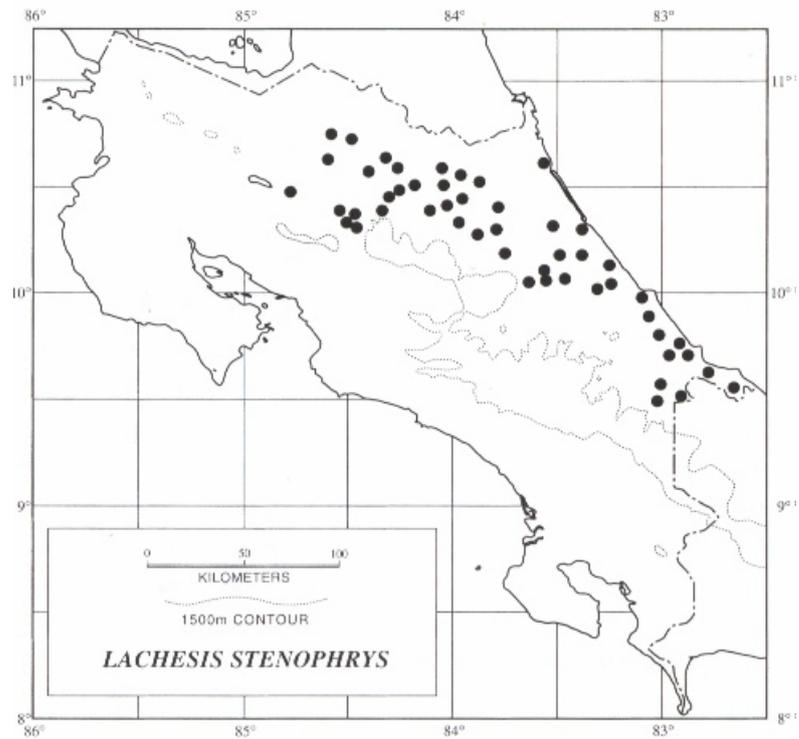


Figura 2.1. Distribución geográfica de las serpientes *Lachesis stenophrys* y *Bothrops asper* en Costa Rica. Tomado de Savage, 2002.

2.2 Accidente y envenenamiento ofídico

Se estima que sólo un 15% de las 3000 especies de serpientes encontradas en el mundo son consideradas potencialmente peligrosas para el ser humano (Gold *et al.*, 2002). En el caso de Costa Rica, aproximadamente 600 personas al año requieren asistencia médica debido a accidentes por mordeduras de serpientes (Bolaños, 1984); no obstante, la cantidad de estos accidentes ofídicos podría ser mayor porque en algunos casos las personas no buscan asistencia médica, y por ende, no son reportados (Gutiérrez, 1995).

La mayoría de los accidentes presentados en Centroamérica se reportan en hombres entre los 5-25 años y están relacionados con actividades agrícolas (Gutiérrez, 1995). Mientras que en Estados Unidos, pocos accidentes se asocian con labores propias de la agricultura, y gran cantidad de mordeduras resultan más bien de la exposición deliberada con serpientes nativas y no nativas que se hallan cautivas (Gold *et al.*, 2002).

Los accidentes ofídicos en Centroamérica son provocados principalmente por vipéridos (“pit vipers”), dentro de los cuales, la especie *Bothrops asper* figura como responsable de alrededor el 50% de los casos (Bolaños, 1984). Igual fenómeno sucede en Costa Rica; aunque se mencionan adicionalmente otras especies causantes de accidentes ofídicos: *Porthidium nasutus* (“tamagá”), *Crotalus durissus* (“cascabel”), *Bothriechis lateralis* (“lora”), *Bothriechis schlegelii* (“bocaracá”) y *Lachesis stenophrys* (“matabuey o cascabel muda”). Por su parte, los accidentes por las serpientes coral (*Micrurus* sp.) sólo representan el 2% de los casos en toda la región centroamericana y 1% en Costa Rica, mientras que, para los accidentes relacionados con la especie *Pelamis platurus* se cuenta con reportes poco exactos de casos de mordeduras (Gutiérrez, 1995; Gutiérrez *et al.*, 2001).

La cantidad, letalidad y composición de los venenos producidos por los ofidios varían con la especie y la edad del reptil (Gold *et al.*, 2002); e incluso la variación puede darse dentro de una misma especie, debido a factores geográficos y ontogénicos (Gutiérrez, 1995). Las mordeduras por *Lachesis stenophrys* usualmente resultan en severos envenenamientos, con un rápido desarrollo de alteraciones sistémicas (Bolaños *et al.*, 1982). De igual forma, las mordeduras de *Bothrops asper* pueden originar serios envenenamientos, ya que esta serpiente tiene la particularidad de liberar gran cantidad de veneno que cualquier otra serpiente de la región (Bolaños, 1972).

La patofisiología del envenenamiento por tobobas (“pit-vipers”) de Centroamérica se encuentra caracterizada por daños locales de tejido que incluyen mionecrosis, hemorragia y edema; y alteraciones sistemáticas tales como hemorragia, coagulopatía, daño renal y choque cardiovascular (Bolaños, 1982; Bolaños, 1984).

Los efectos producidos por el envenenamiento se pueden controlar efectivamente mediante la administración de sueros antiofídicos. Para el caso de la región centroamericana, se cuenta con un importante centro de distribución de antivenenos: el Instituto Clodomiro Picado (Costa Rica), el cual produce suero polivalente efectivo contra el veneno de vipéridos de América Central y algunos de Norte y Sur América, así como suero anti-coral con capacidad de neutralizar el veneno de la mayoría de especies del género *Micrurus*, excepto *Micrurus mipartitus* (Gutiérrez, 1995). En la producción del suero polivalente por parte del Instituto Clodomiro Picado, se inmunizan caballos con una mezcla de los venenos de *Bothrops asper*, *Crotalus durissus* y *Lachesis stenophrys*, ya que estos animales producen grandes cantidades de suero/plasma, y además, pueden tolerar muchas dosis de veneno para desarrollar anticuerpos neutralizantes (Lalloo y Theakston, 2003).

2.3 Componentes tóxicos de venenos de ofidios

Los venenos de serpientes constituyen complejas mezclas de proteínas que varían entre 6-100 kilodaltons (Stocker, 1990). Muchas de éstas poseen propiedades enzimáticas, contribuyendo así con los efectos deletéreos del veneno (Gold *et al.*, 2002).

Los principales efectos tóxicos del veneno de vipéridos han sido observados en los sistemas cardiovascular, hematológico, respiratorio y nervioso (Gold *et al.*, 2002).

2.3.1 Serina Proteasas

Dentro de las enzimas presentes en el veneno de serpientes, las serina proteasas se encuentran entre las enzimas mejor caracterizadas que afectan el sistema hemostático a través de eventos proteolíticos. Se encuentran presentes en el veneno de ofidios de las familias Viperidae, Crotalidae, Elapidae y Colubridae (Serrano y Maroun, 2005).

Las serina proteasas de venenos de serpientes o SVSPs (por sus siglas en inglés) pertenecen a la familia de las tripsinas S1 del clan SA, que corresponde a la gran familia de las peptidasas (Halfon y Craik, 1998). Su acción se efectúa sobre una variedad de componentes de la cascada de la coagulación, en los sistemas kinina-kallicreína y fibrinolítico, y sobre células, causando así un desbalance del sistema hemostático (Serrano y Maroun, 2005).

El mecanismo catalítico que las define es común e incluye un residuo de serina altamente reactivo, el cual juega un papel clave en la formación de un complejo acil-enzimático transitorio, que asimismo se estabiliza por la presencia de los residuos de histidina y ácido aspártico dentro del sitio activo (Barrett y Rawlings, 1995). La mayoría de las SVSPs se encuentran glicosiladas, aunque mostrando un número variable de sitios de glicosilación N- o O-, en una secuencia de posiciones que difiere de una serina proteasa a otra. En su estructura muestran doce residuos de cisteína, diez de los cuales forman cinco puentes de disulfuro, mientras que los dos restantes dan origen a un único y conservado puente entre las SVSPs (envolviendo la Cys245e), encontrado en la extensión C-terminal (Parry *et al.*, 1998).

A través de un estudio de la organización de exón/intrón de regiones proteasa de SVSPs y de la organización completa del gen que codifica para la enzima batroxobina, se propuso que las SVSPs probablemente han evolucionado de una kalicleína glandular, que constituía además una enzima similar a la tripsina. De ahí que las SVSPs y la tripsina comparten una estructura 3D común, y por ende, pertenecen a la familia genética de la tripsina/kalicleína, y no a la de la trombina (Itoh *et al.*, 1988).

A pesar que poseen un alto grado de identidad en su secuencia y estructura 3D, las serina proteasas muestran cierta especificidad hacia diferentes sustratos macromoleculares tales como: fibrinógeno, plasminógeno, factor V, proteína C, entre otros (Serrano y Maroun, 2005). Dicha especificidad es el resultado de sustituciones nucleotídicas no sinónimas que se acumulan en regiones codificantes de la proteína madura, causando así cambios en la secuencia de aminoácidos (Deshimaru *et al.*, 1996). Otras investigaciones sugieren que la base molecular de la especificidad de proteasas y las determinantes del reconocimiento de sustratos involucran la contribución de diversos factores (sitios de unión secundarios o epitopos lineares, entre otros), más que sólo algunos sitios críticos (Serrano y Maroun, 2005).

Las SVSPs afectan las vías de la cascada de la coagulación al activar específicamente componentes de la sangre involucrados en la coagulación, fibrinólisis (degradación de coágulos de fibrina) y agregación de plaquetas, o mediante la degradación proteolítica. Algunas de las SVSPs imitan tareas de la trombina (“thrombin-like enzymes”), las cuales se refieren a su función fibrinogenolítica, o bien a la activación del factor V, de la proteína C y de la agregación de plaquetas. Otras son similares en su accionar a la kallicreína (“kallikrein-like enzymes”) y se encargan de liberar lis-bradiquinina hipotensiva o bradiquinina a partir del kinógeno. Entre las serina proteasas, también se pueden encontrar enzimas que afectan la fibrinólisis. De esta manera, se puede encontrar serina proteasas con una funcionalidad múltiple, mientras que otras muestran una única función, tal como la activación del factor V (ej. RVV-V), proteína C (ej. ACC-C), plasminógeno (ej. TSV-PA) o de las plaquetas, por ejemplo PA-BJ (Serrano y Maroun, 2005).

2.4 Inmunización con ADN

La técnica de inmunización con ADN se basa en la distribución de ADN “desnudo” *in-vivo* con el fin de direccionar la expresión de proteínas que actúan como antígenos para la producción de anticuerpos respectivos, tras la activación de una respuesta inmune (Garmory *et al.*, 2003). Estas proteínas se utilizan como punto de partida para generar anticuerpos que ayudarán a neutralizar los efectos de cualquier desorden mediado por agentes biológicos (bacterias, virus, parásitos) o algún componente tóxico animal. El potencial de esta técnica fue demostrado por primera vez en 1990 a partir de la transferencia genética directa de un plásmido de ADN dentro del músculo de ratón, sin necesidad de un sistema de distribución especial (Wolff *et al.*, 1990).

Como vectores para este tipo de inmunización, se emplean, a menudo, plásmidos derivados de bacterias, a los cuales se les insertan genes (transgenes) bajo el control de promotores eucariotas, permitiendo así la expresión de proteínas que actúan como antígenos en células de mamíferos (Garmory *et al.*, 2003). El constructo de ADN resultante se le suele denominar vacuna de ADN.

Las técnicas convencionales de inmunización recurren a la utilización de microorganismos inactivados o componentes purificados de éstos (vacunas inactivadas), o bien, microorganismos atenuados, pero aún infecciosos (vacunas vivas). Las vacunas inactivadas tienen excelentes registros de seguridad, pero usualmente requieren adyuvantes inmunopotenciadores e inyecciones de refuerzo para estimular suficientes respuestas inmunes protectoras. Por su parte, la mayoría de vacunas vivas son capaces de lograr una protección similar y más durable, esto debido a que imitan una infección natural. La única desventaja de utilizar microorganismos atenuados radica en que éstos puedan lograr recobrar su poder infeccioso original; es decir, su modo de acción está basado en un estrecho y delicado balance entre competencia de replicación y carencia de patogenicidad, y entre (sobre) atenuación y (falta de) eficiencia. Sin embargo, las vacunas vivas son potentes estimuladores de respuestas CTL (Linfocitos T Citotóxicos, por sus siglas en inglés) y particularmente exitosas contra enfermedades virales, ya que los antígenos relevantes y blancos para los mecanismos efectores inmunes se encuentran localizados en o sobre las células, los cuales en ciertos casos no son accesibles para los anticuerpos humorales. Las vacunas de ADN aparentemente logran combinar las características más importantes de ambos tipos de métodos de inmunización convencional, puesto que, por un lado se consideran no infecciosas, pero además producen antígenos *in-vivo*, lo cual es un importante pre-requisito para estimular células T citotóxicas y respuestas inmunes óptimas (Gregersen, 2001).

2.4.1 Diseño de plásmidos

El diseño de los vectores plasmídicos debe cumplir con requerimientos básicos tales como: promotores eucariotas, un sitio de clonación múltiple, una secuencia poliadenilada, un marcador de selección y un origen de replicación bacterial (Gurunathan *et al.*, 2000). La utilización de promotores fuertes podría ser requerida para optimizar la expresión en células de mamíferos, de ahí que algunos promotores han sido derivados de virus como CMV (citomegalovirus) o SV40 (virus 40 del simio). Además, se debe proveer un sitio de clonación corriente abajo del promotor para la inserción de genes heterólogos y la inclusión de una secuencia poliadenilada (poliA), esto con el fin de estabilizar los futuros transcritos de ARNm. La mayoría de marcadores de selección empleados corresponden a genes de resistencia a antibióticos, por ejemplo el gen de resistencia a la ampicilina. En cuanto a los orígenes de replicación, se ha generalizado en muchos casos la utilización del origen de replicación ColE1 de *Escherichia coli*, puesto que el mismo provee un alto número de copias, lo cual facilita su preparación a gran escala (Garmory *et al.*, 2003).

Asimismo, Garmory *et al.* (2003) han sugerido analizar el uso de promotores/amplificadores (“enhancers”) como el promotor/amplificador-inmediatamente temprano del CMV, promotores específicos de tejidos (ej. promotores de la creatina kinasa y de la metalotienina), secuencias de Kozak (que flanquean el codón de iniciación AUG dentro del ARNm) y de codones selectivos en genes, como estrategias para mejorar la expresión génica.

La eficiencia en la producción de inmunoglobulinas IgG por vacunas basadas en plásmidos de ADN fue estudiada tras utilizar diferentes promotores eucariotas (CMV, CMV-TE, EF-1 α y UbC) en el plásmido pVAX1, siendo el promotor de la UbC (ubiquitina C humana) el que ofreció un mayor nivel de protección contra antígenos bacterianos basados en el fragmento Hc de la toxina botulínica tipo F. No obstante, otra investigación demuestra que la utilización del promotor CMV (Citomegalovirus humano) en el vector pCI (Promega, Madison, WI, USA) genera altos títulos de anticuerpos en ratones, ratas y conejos en alrededor 5-6 semanas, cuando dicho vector se distribuye vía intravenosa (Bates *et al.*, 2006). Resultados como los anteriores muestran la importancia de la optimización de elementos regulatorios en los vectores plasmídicos a ser empleados en terapias de inmunización (Jathoul *et al.*, 2004).

Los plásmidos además pueden ser diseñados como vectores bicistrónicos, donde se concibe la inclusión de dos genes bajo el control de un solo promotor, lo cual permite expresar, además del antígeno, otras moléculas como citoquinas y algunos co-estimulantes del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC) o del receptor de células T, que facilitan el desarrollo de una respuesta inmune (Gregersen, 2001).

2.4.2 Respuesta inmune mediada por plásmidos recombinantes

La respuesta inmune desencadenada por la inoculación de constructos de ADN plasmídico puede, al igual que con cualquier antígeno que ingresa al cuerpo, estimular la respuesta inmune humoral mediada por los linfocitos B, o la respuesta inmune celular liderada por linfocitos T. Dicha activación del sistema inmune contra antígenos específicos permite asimismo la creación de células de memoria, que pueden detectar rápidamente la presencia de los mismos antígenos y hacer que el sistema inmune actúe de forma más rápida y efectiva.

En la respuesta humoral, una vez que la vacuna de ADN entra en las células blanco y la información genética se transcribe y traduce, las proteínas resultantes se liberan fuera de la célula, donde se unirán a receptores de células B, lo cual genera una señal de activación para la multiplicación de este tipo de células. Parte de estas células se encargarán de secretar anticuerpos, mientras que otras se convertirán en células B de memoria. La activación de células B, requiere que células profesionales presentadoras de antígenos (APC, por sus siglas en inglés) capturen las moléculas antigénicas por pinocitosis (vía inespecífica) o por endocitosis mediada por receptor –fragmento Fc de inmunoglobulina o complemento- (vía específica), las proteolice y que los péptidos resultantes sean presentados por moléculas MHC clase II, estimulando esto el reconocimiento posterior de células T cooperadoras (CD4+), y por ende, la secreción de citocinas Th2 que activarán a las células B que se encuentran unidas a antígenos (Greguersen, 2001; Weiner y Kennedy, 1999).

Por su lado, la respuesta celular requiere igualmente que el vector plasmídico ingrese dentro de la célula para que el antígeno expresado sea digerido proteolíticamente por proteosomas, siendo los péptidos resultantes ensamblados con moléculas MHC clase I en el retículo endoplasmático (Greguersen, 2001). Estas moléculas se encargarán de llevar a los péptidos antigénicos hasta la membrana plasmática, cuya unión con determinadas células T citotóxicas induce su multiplicación, y por consiguiente, su función de destruir otras células exhibiendo el mismo péptido. Asimismo, algunas de estas células T activadas se convertirán en células T citotóxicas de memoria. De igual manera, la activación de las células T citotóxicas involucra las APC, las cuales luego de tomar las vacunas de ADN y sintetizar las proteínas antigénicas, deben exhibir los fragmentos derivados del procesamiento en moléculas MHC clase I junto con moléculas co-estimulantes. Así, las células T citotóxicas proceden a reconocer el complejo antígeno-co-estimulante, y tras su unión, se estimula la exhibición de receptores de citocinas Th1, liberadas por células T cooperadas (CD8+) y que al final terminarán de activar las células T citotóxicas. Además, otras células T cooperadoras de memoria son estimuladas por los plásmidos de ADN (Weiner y Kennedy, 1999).

La estrategia de inmunización genética contempla una variedad de métodos de liberación génica, incluyendo la inyección directa de ADN plasmídico “desnudo” dentro del músculo esquelético, nódulos linfáticos o la dermis; la electroporación; la balística mediante el empleo de una pistola de genes (“GeneGun”) y vectores virales. De estos métodos, la inyección directa de plásmidos de ADN presenta importantes atractivos para los propósitos de inmunización genética: se dispone de excelentes vectores de expresión fácilmente disponibles, la producción de ADN plasmídico es fácil y accesible (en contraste con los vectores virales), y no requiere equipo muy complejo, a diferencia de la balística y la electroporación (Bates *et al.*, 2006).

La mayoría de plásmidos de ADN se aplican como una solución salina fisiológica. Las preparaciones salina/plásmido, por lo general, se inyectan intramuscular o intradermalmente (Gregersen, 2001). No obstante, también se ha reportado la inyección vía intravenosa para la liberación de ADN plasmídico, tal es el caso de los sistemas de administración hidrodinámica a través de la vena de la cola o extremidad (HTV o HLV respectivamente, por sus siglas en inglés) descritos para animales de investigación (Zhang *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 1999; Hagstrom *et al.*, 2004).

A diferencia de la vía intramuscular de inmunización que presenta la desventaja de bajas eficiencias de transfección, especialmente en animales de investigación de gran tamaño (Jiao *et al.*, 1992), la intravenosa reporta alta eficiencia de transfección, al mismo tiempo que su implementación no requiere de equipo sofisticado cuando se compara con otros métodos como la balística para inmunización vía intradérmica (Bates *et al.*, 2006).

La pistola de genes propulsa con helio comprimido plásmidos, precipitados sobre partículas inertes, dentro de las células cerca de la superficie del cuerpo, especialmente aquellas células de la piel o de las membranas mucosas (Gregersen, 2001). Una vez dentro de la célula, algunos de los plásmidos recombinantes se dirigen al núcleo y dan instrucciones a la célula para sintetizar las proteínas antigénicas que mantienen codificadas (Weiner y Kennedy, 1999).

De acuerdo con la vía de inmunización empleada se puede favorecer respuestas humorales o celulares, e incluso pueden desarrollarse ambas. En relación con esto, se ha encontrado que la inmunización sobre la epidermis, rica en células dendríticas, puede inducir respuestas inmunes con una fuerte tendencia al tipo humoral Th-2, mientras que, la estrategia intramuscular (inyección sobre células musculares) generalmente estimula respuestas del tipo celular Th-1 (Feltquate *et al.*, 1997; Harrison y Bianco, 2000). Por su lado, la utilización del sistema intravenoso HLV en ratones, aparentemente tiene la capacidad de estimular, a través del reclutamiento de células presentadoras de antígenos (APCs) facultativas y profesionales, respuestas celulares CD8+ y CD4+, así como también, facilitar respuestas humorales (Bates *et al.*, 2006).

2.4.3 Desarrollo de anticuerpos específicos

Los protocolos tradicionales de inmunización con veneno de serpientes, por lo general, se han caracterizado por no direccionar la respuesta inmune hacia la especificidad, de ahí que los antivenenos obtenidos contienen anticuerpos para la mayoría de los componentes del veneno, sin tomar en cuenta su toxicidad o inmunogenicidad (Harrison, 2004). Además, esto implica que los sueros antiofídicos presentan numerosos anticuerpos redundantes para los antígenos no tóxicos del veneno, diluyendo así aquellos específicos para los verdaderos componentes tóxicos (Theakston y Reid, 1983).

Debido a lo anterior, el desarrollo de protocolos de inmunización que generen anticuerpos específicos para las principales toxinas podría incrementar la eficacia de la dosis de antivenenos, y por ende, reducir el riesgo de reacciones tempranas anafilácticas y tardías de enfermedad del suero, ambas asociadas con la administración de grandes volúmenes de antivenenos equinos y ovinos (Malasit *et al.*, 1986).

La inmunización con ADN codificante para las toxinas de importancia médica se ha descrito como una técnica promisorio para favorecer la especificidad de anticuerpos, ya que la expresión de ADN derivado de serpientes en ambientes eucariotas permite la presentación al sistema inmune de proteínas, que en teoría, deberían representar fielmente la configuración terciaria de las toxinas nativas, y así, iniciar rápidamente potentes respuestas de anticuerpos a partir de cantidades mínimas de proteínas expresadas en las células transfectadas por el ADN (Harrison, 2004).

Bibliotecas de ADNc obtenidas a partir de glándulas de veneno de serpientes han sido construidas para varias especies, y en consecuencia, diversos clones codificantes de toxinas como serina proteasas han sido aislados y secuenciados. Un porcentaje de 9,6%, correspondiente para las serina proteasas, ha sido determinado en un estudio de las toxinas presentes en las glándulas del veneno de *Bothrops insularis* empleando microsatélites ESTs (Junqueira-de-Azevedo y Ho, 2002). Por esta razón, se les considera una de las clases comunes de toxinas expresadas por vipéridos.

Las SVSPs constituyen proteínas de una sola cadena codificadas por ADNc que contienen un marco abierto de lectura (ORF, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 800 pares de bases. Además, las regiones 5' no traducidas (5'-UTR, por sus siglas en inglés) usualmente son cortas, mientras que las 3'-UTR varían en longitud y pueden contener más de 1200 nucleótidos. SVSPs se sintetizan como zimógenos de 256-257 a.a. con un péptido señal putativo de 18 a.a. y un péptido de activación propuesto de seis residuos de amino ácidos: Gln-Lys-Ser-Ser-Glu-Leu.

La batroxobina constituye la primera serina proteasa en ser expresada en forma insoluble en *Escherichia coli*, y subsecuentemente, replegada para producir una enzima activa (Maeda *et al.*, 1991). Otras SVSPs recombinantes expresadas en *E. coli* incluyen la TSV-PA de *T. stejnegeri* (Zhang *et al.*, 1997), acutin y mucrosobin (Pan *et al.*, 1999; Guo *et al.*, 2001). Haly-PA obtenida de *Agkistrodon halys* ha sido expresada exitosamente empleando un sistema de baculovirus (Park *et al.*, 1998). La utilización de vectores basados en levaduras también ha sido reportado, tal es el caso de la levadura *Pichia pastoris*, utilizada para la expresión de dos SVSPs glicosiladas activas: gussurobin de *Gloydius ussuriensis* (Yang *et al.*, 2002) y ACC-CC de *Agkistrodon contortix* (Kunes *et al.*, 2002).

CAPÍTULO 3

OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Inmunizar animales de experimentación con ADNc que codifican para una serina proteasa del veneno de *Lachesis stenophrys* y evaluar la respuesta inmune humoral generada, así como realizar una subclonación de una serina proteasa del veneno de *Bothrops asper* en un nuevo vector de expresión.

3.2 Objetivos Específicos

- Inmunizar ratones con el ADNc que codifica para una serina proteasa del veneno de la especie *Lachesis stenophrys*, clonada en el vector de expresión en eucariotas pCI, mediante vía intravenosa.
- Evaluar la eficiencia de la estrategia de inmunización vía intravenosa con el plásmido recombinante (pCI-SP *L. stenophrys*) mediante la determinación del nivel de anticuerpos IgGs generados.
- Realizar un proceso de subclonaje de una serina proteasa de *Bothrops asper*, clonada en el vector de expresión pCI, en el plásmido de ADN pVAX1-UbC, así como verificar la orientación correcta del inserto a través de digestión con enzimas de restricción.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Preparaciones de pCI-SP (*L. stenophrys*) y pCI

Se realizaron transformaciones de células competentes de la cepa XL1-Blue de *Escherichia coli* con el vector de expresión pCI (Promega, USA) y el plásmido codificante para la serina proteasa de *Lachesis stenophrys*, la cual fue previamente clonada en el plásmido pCI en el Instituto Clodomiro Picado, San José, Costa Rica (Arce, 2005), denominándose el vector resultante como pCI-SP *L. stenophrys*.

El vector de expresión empleado posee un tamaño de 4006 pares de bases y se encuentra diseñado con los siguientes componentes (Ver figura 4.1): 1) una región promotora/potenciadora del citomegalovirus humano (CMV), la cual permite la expresión constitutiva de genes en diversos tipos de células; 2) el intrón quimérico β -globina/IgG que puede incrementar la expresión según el tipo de inserto; 3) el promotor para la ARN polimerasa T7; 4) un sitio de clonación múltiple; 5) un sitio para la señal tardía de poliadenilación del SV40 (virus 40 del simio, por sus siglas en inglés); 6) el origen de replicación del fago f1; 7) una región codificante para la β -lactamasa (Amp^r), la cual brinda resistencia contra el antibiótico ampicilina; y 8) un origen de replicación derivado del plásmido *ColE1*.

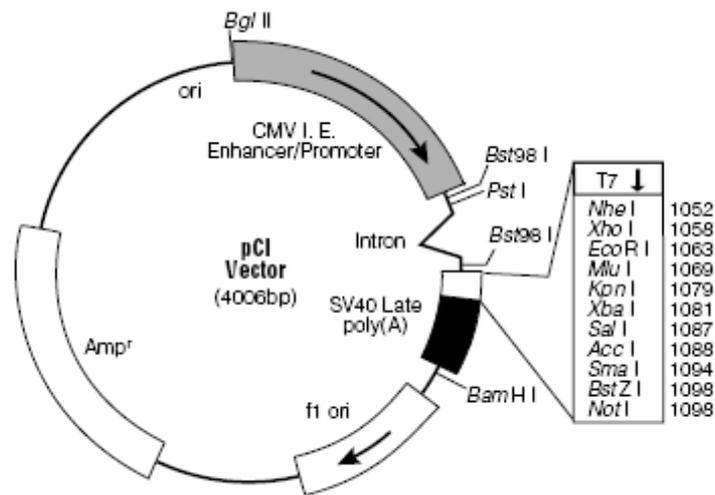


Figura 4.1. Mapa del vector de expresión pCI (Promega, USA).

Las colonias de *Escherichia coli* transformadas con pCI y pCI-SP se cultivaron en caldo Luria-Bertani (250 mL) complementado con ampicilina (100 µg/mL); y a partir de estos cultivos se realizaron preparaciones a gran escala (maxipreparaciones) de ambos tipos de plásmidos. La calidad y señal de las preparaciones anteriores se comprobaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, linearizando previamente la muestra plasmídica con la enzima de restricción EcoRI (Fermentas, USA), cuyo sitio de reconocimiento se encuentra en la región de clonación múltiple. Asimismo, se determinó la concentración de las maxipreparaciones respectivas en un cuantificador WPA UV1101 Biotech Photometer (Biochrom Ltd., Cambridge, England).

4.2 Inmunización de ratones controles

Grupos de cinco ratones (18-20 g) de la cepa CD-1 fueron sometidos a un esquema de inmunización con el veneno de *Bothrops asper* del Pacífico o el de *Lachesis stenophrys*. El suero de estos ratones, una vez finalizadas las inmunizaciones, constituiría el control positivo para la comparación con las inmunizaciones con ADN. No obstante, antes de iniciar con los esquemas de inmunización se procedió a extraer suero pre-inmune, que representaría el control negativo. Cabe destacar que se incluyó dentro de este esquema de inmunización la inoculación del veneno de *B. asper*, dado a pruebas futuras de inmunización con ADN por realizar, de manera que posteriormente se contara con este control positivo.

Los esquemas de inmunización se realizaron con inoculaciones vía intraperitoneal de 100 µl de cada dosis por un período de 40 días (Ver Tabla 4.1), al cabo de los cuales se efectuaron sangrías de prueba para analizar, mediante pruebas de ELISA, la respuesta inmune generada.

Tabla 4.1. Esquemas de inmunización de ratones CD-1 con veneno completo de *Bothrops asper* del Pacífico y *Lachesis stenophrys*.

Días	<i>Bothrops asper</i> *		<i>Lachesis stenophrys</i> *	
	Dosis (µg)	Adyuvante	Dosis (µg)	Adyuvante
1	5	Freund Completo	6	Freund Completo
8	5	Alginato de sodio	6	Alginato de sodio
16	10	Alginato de sodio	10	Alginato de sodio
24	10	Alginato de sodio	10	Alginato de sodio
32	15	Alginato de sodio	14	Alginato de sodio
40	15	Alginato de sodio	14	Alginato de sodio
48	Sangría de Prueba		Sangría de Prueba	

* El veneno de *B. asper* tiene un LD₅₀ de 51.08 µg, mientras que para el veneno de *L. stenophrys* el LD₅₀ es de 127 µg.

4.3 Inmunización de ratones con pCI-SP (*L. stenophrys*) y pCI

Se dispuso de grupos de diez ratones de la cepa CD-1, con un peso inicial de 18-20 g, para efectuar la inmunización con el plásmido recombinante (pCI-SP) y control (pCI) durante un período de ocho semanas (Ver Tabla 4.2). Previamente a la inmunización con cada tipo de plásmido, se obtuvieron muestras de suero pre-inmune para las pruebas de ELISA posteriores.

La concentración de ADN ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) correspondiente a las maxipreparaciones se ajustó de tal manera que se cumpliera con una dosis de 30, 60 o 120 μg de ADN en cada inoculación (Ver esquema de inmunización), realizada en la cola de los ratones por vía intravenosa. Los plásmidos de ADN se resuspendieron en una solución de PBS al 1%, administrándose en la vena de la cola un volumen de 100 μl por cada ratón. A partir del día 16 del esquema de inmunización, se procedió a tomar muestras de sangre de cada ratón el día posterior a la inmunización respectiva, para extraer la fracción correspondiente al suero y realizar las pruebas de ELISA, esto con el fin de monitorear el desarrollo de respuesta inmune a través de la producción de anticuerpos (inmunoglobulinas).

Tabla 4.2. Esquema de inmunización de ratones CD-1 con el plásmido recombinante pCI-SP (*L. stenophrys*) y con el plásmido control pCI.

Días		Dosis (μg)
1		30
8		30
16		30
24	Sangría de Prueba	30
32	Sangría de Prueba	30
40	Sangría de Prueba	60
48	Sangría de Prueba	60
56	Sangría de Prueba	60
64	Sangría de Prueba	120
72	Sangría de Prueba	120
80	Sangría de Prueba	120

4.4 Extracciones de suero murino

Para las diferentes extracciones de suero murino, se procedió a sangrar ratones de la cola, para lo cual se realizó un pequeño corte transversal con tijera en la punta de la cola, y seguidamente, se llenó tubos capilares heparinizados. Una vez obtenido las muestras de sangre, los capilares se sellaron por un extremo y centrifugaron por cinco minutos en una centrífuga Micro-Hematocrit IEC MB Centrifuge (Damon/IEC Division, Needham Heights, MA, USA) que alcanza las 11700 rpm. Al cabo de este tiempo, se obtuvieron dos fases visiblemente separadas, donde la más clara representaba la fracción correspondiente al plasma.

4.5 Evaluación de la respuesta inmune por ELISA

La evaluación de la respuesta inmune de los ratones inmunizados con el veneno completo (controles +) y con los plásmidos pCI y pCI-SP se realizó mediante la técnica de ELISA para monitorear de esta forma el título de anticuerpos generados.

Para dicha técnica, placas poliestireno de 96 pozos (Dynex, USA) fueron recubiertas con 0.5 µg del veneno correspondiente diluido en un buffer de recubrimiento (Tris 0.1 M, NaCl 0.15 M, pH 9.0), agregando un volumen de 100 µl por hoyo. Las placas se incubaron por 24 horas a 4°C, y luego se descartó el contenido de los pozos por inversión. Seguidamente, se procedió a bloquear los espacios no ocupados por el antígeno en cada pozo con caseína al 2% en PBS, y se incubó las placas por 30 min a temperatura ambiente. Luego de descartar la caseína por inversión, se colocó 100 µl por pozo de cada uno de los sueros diluidos en caseína al 1% en PBS. Con respecto, a la inmunización de ratones con veneno completo se emplearon cinco diluciones con factor de cinco (empezando con una dilución de 1/10) de las muestras de sueros previamente extraídos, mientras que para los sueros de ratones inmunizados con el plásmido pCI y el recombinante pCI-SP se emplearon diluciones 1/300, 1/1600 y 1/1200. Como control negativo de la prueba se utilizó el suero pre-inmune, y como control positivo, se empleó el suero extraído de ratones tratados con veneno completo, esto último para los ELISA referentes a la inmunización con pCI-SP *L. stenophrys*. Las placas con muestras de sueros fueron incubadas por una hora a temperatura ambiente, y posteriormente, se lavaron cinco veces con buffer de lavados 1X (Tris 0.05 M, NaCl 0,15 M, ZnCl₂ 20 µM, MgCl₂ 1 mM, pH 7.4).

La detección de los complejos anticuerpo-antígeno se efectuó con anti-anticuerpos (anti-IgG) de ratón conjugados con fosfatasa alcalina (Sigma, USA), los cuales fueron diluidos con caseína al 1% en PBS, procediendo a agregar 100 μ l por pozo e incubando por una hora a temperatura ambiente. Finalmente, se realizó cinco lavados de las placas y se adicionó 100 μ l por pozo del sustrato p-nitrofenilfosfato (Sigma, USA) disuelto en buffer sustrato ($MgCl_2$ 0.001 M, Dietanolamina 0.09 M, pH 9.8). Tras incubar a temperatura ambiente (protegiendo de la luz) por 15 min se realizó una primera lectura de la absorbancia a 405 nm en un lector Multiskan (Labsystems, Finlandia); no obstante, se realizaron otras lecturas hasta que la señal de reacción se mantuviera constante.

4.6 Subclonaje de serina proteasa de *B. asper* en pVAX1

Se desarrolló una estrategia de subclonaje que tenía como objeto trasladar el ADN copia de una serina proteasa del veneno de *Bothrops asper*, originalmente clonado en el plásmido pCI (Promega, USA), hacia un nuevo vector de expresión plasmídico: pVAX1 (Invitrogen, USA), diseñado para implementarse en el desarrollo de vacunas de ADN. Las características de este vector permiten una replicación en un alto número de copias en *E. coli* y un alto nivel de expresión de las proteínas de interés en la mayoría de células de mamíferos.

El plásmido pVAX1 posee un tamaño de 3000 pares de bases y está conformado por los siguientes componentes (Ver figura 4.2): 1) el promotor del citomegalovirus humano inmediatamente temprano (CMV), para asegurar un alto nivel de expresión en un amplio rango de células de mamíferos; 2) la región promotor T7/sitio del imprimador, que permite la transcripción *in-vitro* en orientación sentido y secuenciación a través del inserto; 3) sitio de clonación múltiple; 4) sitio del imprimador reverso BGH (hormona de crecimiento bovina), que también permite secuenciar el inserto; 5) la señal de poliadenilación de la BGH para una eficiente terminación de la transcripción y poliadenilación del ARNm; 6) gen de resistencia para la kanamicina para seleccionar clones de *E. coli* y 7) y sitio de origen pUC que faculta la replicación en alto número de copias y crecimiento en *E. coli*.

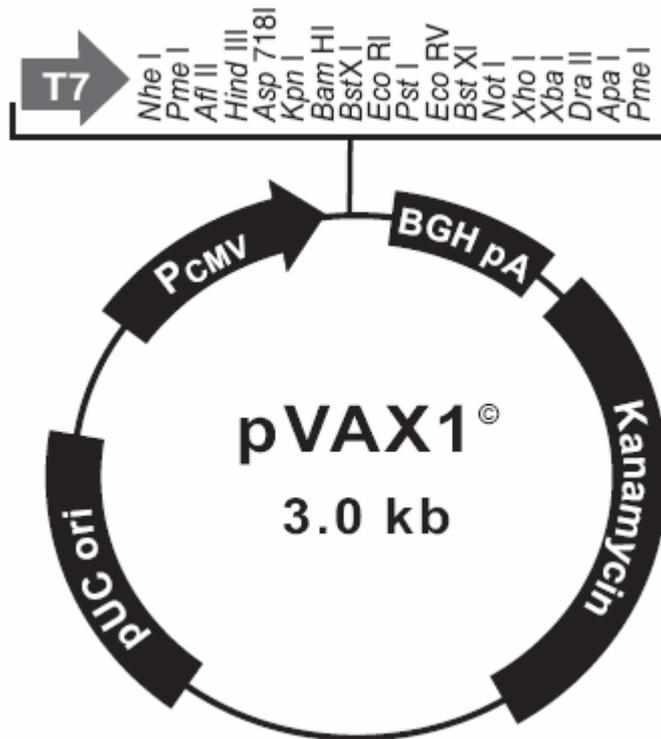


Figura 4.2. Mapa del vector de expresión pVAX1 (Invitrogen, USA).

El vector utilizado en la estrategia de subclonaje presentaba algunas modificaciones respecto al vector original pVAX1 (Invitrogen, USA), las cuales se encuentran descritas por Garmory *et al.* (2004). En resumen, se reporta la extracción del gen GFPuv a partir del vector pGFPuv (Clontech) usando las enzimas Kpn I y EcoRI, y su clonación en pVAX1 (Invitrogen, USA), empleando los mismos sitios de restricción. Lo anterior dio origen al vector pVAX1-CMV-GFPuv. Posteriormente, el promotor UbC (Ubiquitina C) del plásmido pUB6/V5-His A (Invitrogen, USA) fue removido por digestión con las enzimas Bgl II y Hind III, y seguidamente clonado dentro de pVAX1-CMV-GFPuv, que fue digerido antes con Spe I y Hind III, esto con el fin de extraer el promotor CMV. De esta manera, se obtuvo el vector pVAX1-UbC-GFPuv.

Minipreparaciones de los plásmidos de expresión pCI-SP (*Bothrops asper*) y pVAX1-UbC-GFPuv fueron realizadas a partir de cultivos de la cepa XL1-Blue de *Escherichia coli*, previamente transformada. Una vez extraído el plásmido pVAX1-UbC-GFPuv, se digirió con las enzimas de restricción Hind III y EcoRI (Fermentas, USA) con el fin de extraer la secuencia codificante para la GFP (proteína verde fluorescente), la cual se encontraba codificada en el vector de clonación mencionado.

El vector resultante del proceso de restricción, denominado pVAX1.1, fue analizado en gel de agarosa al 1%, mediante comparación con el vector pVAX1-UbC-GFPuv. Una vez comprobada la extracción del fragmento codificante para la GFP, se realizó una reacción de ligación (Blunting and Ligation Kit, Fermentas, USA) y consecuente transformación de células competentes de la cepa XL1-Blue de *Escherichia coli*.

Previo al subclonaje, se realizaron minipreparaciones del plásmido pVAX1.1 con el Kit JetQuick Plasmid Miniprep Spin (Genomed, Germany). Seguidamente, el plásmido pVAX1.1 fue linearizado con la enzima de restricción Not I (Fermentas, USA). Los extremos pegajosos generados se eliminaron mediante la acción de la enzima Nucleasa S1 (New England BioLabs®, USA); y finalmente, se realizó una desfosforilación del fragmento resultante con la enzima Fosfatasa Alcalina del Intestino de Ternero -CIP- (New England BioLabs®, USA). Purificaciones del ADN fueron necesarias luego del tratamiento con cada una de las enzimas, empleando para ello el kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega, USA).

Por otro lado, se amplificaron por PCR los ADNc que codifican para la serina proteasa de *Bothrops asper*, los cuales se hallaba clonados en el plásmido pCI. Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes finales de 50 µl bajo las siguientes condiciones: 5 µl de ADN y concentraciones finales de 1.92 mM de dNTPs (Invitrogen), 1X búffer Pfu con MgSO₄ (Fermentas, USA), 0.15 µM de los imprimadores BTXU177/BTXL961 y 2.5 U de enzima polimerasa con actividad de corrección 3'→5' (Fermentas, USA). El perfil térmico establecido incluía 25 ciclos de 95°C por 5 min, 95°C por 1 min, 60.1°C por 1 min (temperatura de hibridación de los imprimadores) y 72°C por 3 min. Finalmente, se estableció un período de extensión a 72°C por 10 min. Los productos de PCR obtenidos fueron chequeados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, y fueron purificados con el kit Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega, USA).

Una vez purificados el vector pVAX1.1 y los productos de PCR correspondientes a las secuencias de serina proteasas (insertos), se procedió a realizar un clonaje de los insertos en pVAX1.1. El mismo se efectuó mediante una reacción de ligación (Blunting and Ligation Kit, Fermentas, USA). Células competentes de la cepa XL1-Blue de *Escherichia coli* fueron transformadas con 10 µl de la mezcla de ligación para la obtención de los clones a gran escala.

Las colonias obtenidas a partir de la transformación fueron analizadas mediante digestiones con enzimas de restricción, con el fin de verificar la presencia de los insertos y la dirección de los mismos en el plásmido pVAX1.1.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

5.1 Preparaciones de pCI-SP (*L. stenophrys*) y pCI

Las preparaciones a gran escala por método manual de ambos plásmidos fueron chequeadas a través de un gel de agarosa al 1% (100 V y 150 mA), digiriendo previamente con EcoRI (Fermentas, USA) 1 μ l de cada plásmido en un volumen total de 20 μ l por reacción de restricción (Ver Figura 5.1). El gel de agarosa cargado con 4 μ l de la reacción anterior mostró una buena señal del vector recombinante y control, al mismo tiempo que denotaba la presencia de ADN sin muestra de degradación alguna. El tamaño en pares de bases fue determinado aproximadamente en 4000 pb para pCI y 5000 pb para pCI-SP (*L. stenophrys*), esto según el marcador de peso molecular MassRuler™ DNA Ladder High Range (Fermentas, USA).

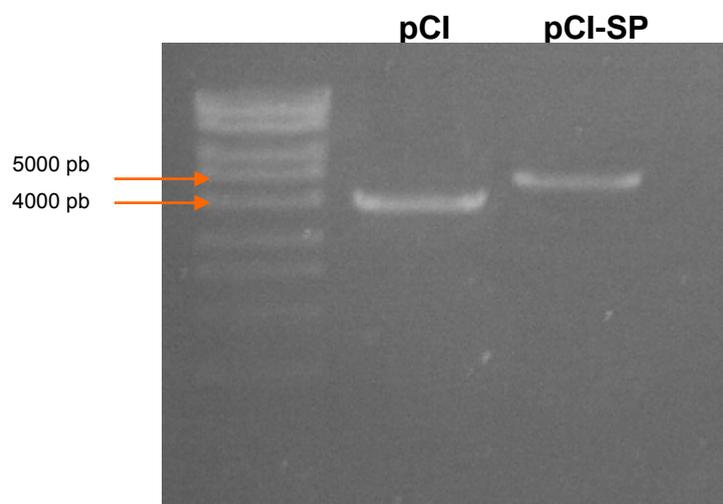


Figura 5.1. Comprobación de la pureza del ADN correspondiente a las maxipreparaciones de pCI y pCI-SP (*L. stenophrys*). En ambos casos los plásmidos fueron digeridos con la enzima EcoRI.

5.2 Inmunización de ratones controles

Los esquemas de inmunización utilizados para la inoculación del veneno completo de *Bothrops asper* y *Lachesis muta* en ratones de la cepa CD-1 se efectuaron durante 40 días, siguiendo las especificaciones detalladas en la tabla 4.1 (Ver sección de Materiales y Métodos). La sangría de prueba, realizada una semana después de la última inmunización, permitió obtener suero murino tras centrifugar los capilares de sangre obtenidos. El análisis de ELISA, aplicado con el suero de cinco ratones inoculados con veneno de *Lachesis muta* y cuatro ratones inoculados con veneno *Bothrops asper* (durante el período de inmunización murió uno de los ratones), se utilizó para evaluar el nivel de anticuerpos generados (IgGs), a través de cinco diluciones realizadas a partir de los sueros extraídos, incluido el suero pre-inmune como control negativo, lo cual se muestra en la figura 5.2.

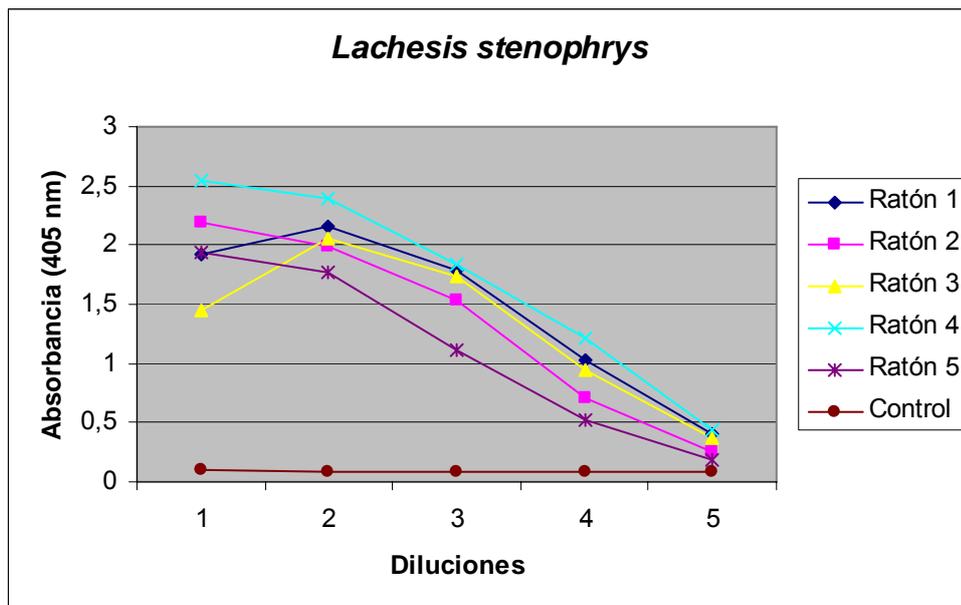
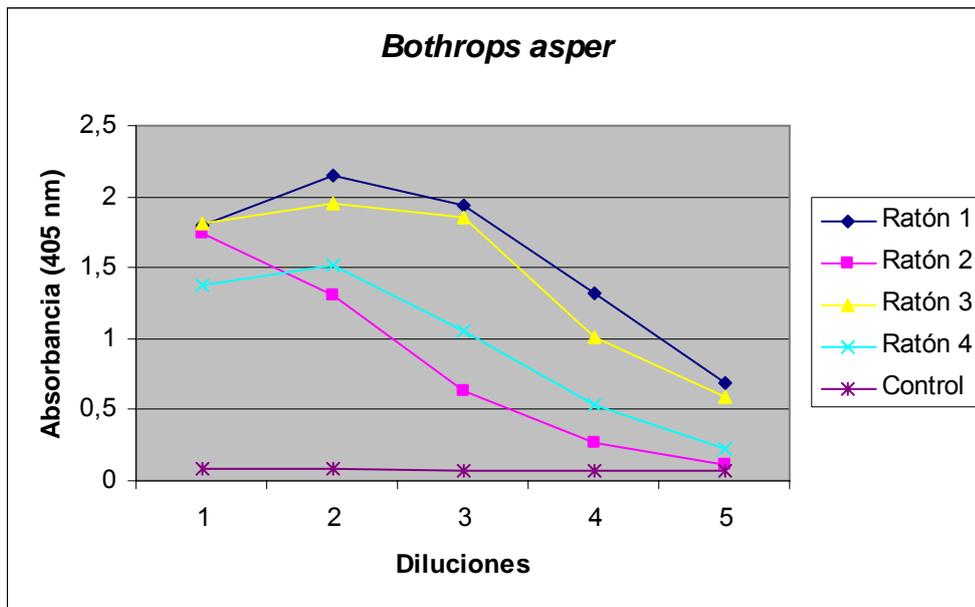


Figura 5.2. Determinación del nivel de anticuerpos generados en ratones controles inmunizados con veneno completo de *Bothrops asper* y *Lachesis stenophrys* por un periodo de 40 días. Con cada muestra de suero se aplicaron cinco diluciones con factor de 5, empezando con una dilución 1/10.

5.3 Inmunización de ratones con pCI y pCI-SP (*L. stenophrys*)

Tras realizar las inmunizaciones vía intravenosa con el plásmido recombinante pCI-SP (*L. stenophrys*) por 80 días, tal y como se detalló en la tabla 4.2 (Ver sección de Materiales y Métodos), no se observó una señal de anticuerpos significativa, esto de acuerdo con las pruebas de ELISA realizadas a partir de la tercera semana de inmunización con las muestras de suero extraídas de los ratones inmunizados. Igual comportamiento se presentó con la inoculación del plásmido pCI (Promega, Madison, WI, USA), al constituir éste el control de comparación durante el período de inmunización respectivo. La figura 5.3 muestra el nivel de anticuerpos específicos en el suero para antígenos del veneno de *Lachesis stenophrys* para cada uno de los ratones inmunizados con el plásmido recombinante, así como el nivel de anticuerpos presentado en una mezcla de sueros extraídos de los ratones inmunizados con el vector pCI durante los 80 días de inmunización. Asimismo, se incluye en la figura la comparación de las inmunizaciones anteriores con el suero pre-inmune de los ratones referentes al tratamiento con pCI-SP. Se omitió en la figura los resultados correspondientes a los ratones 3 y 4, debido a que murieron durante el período de inmunización.

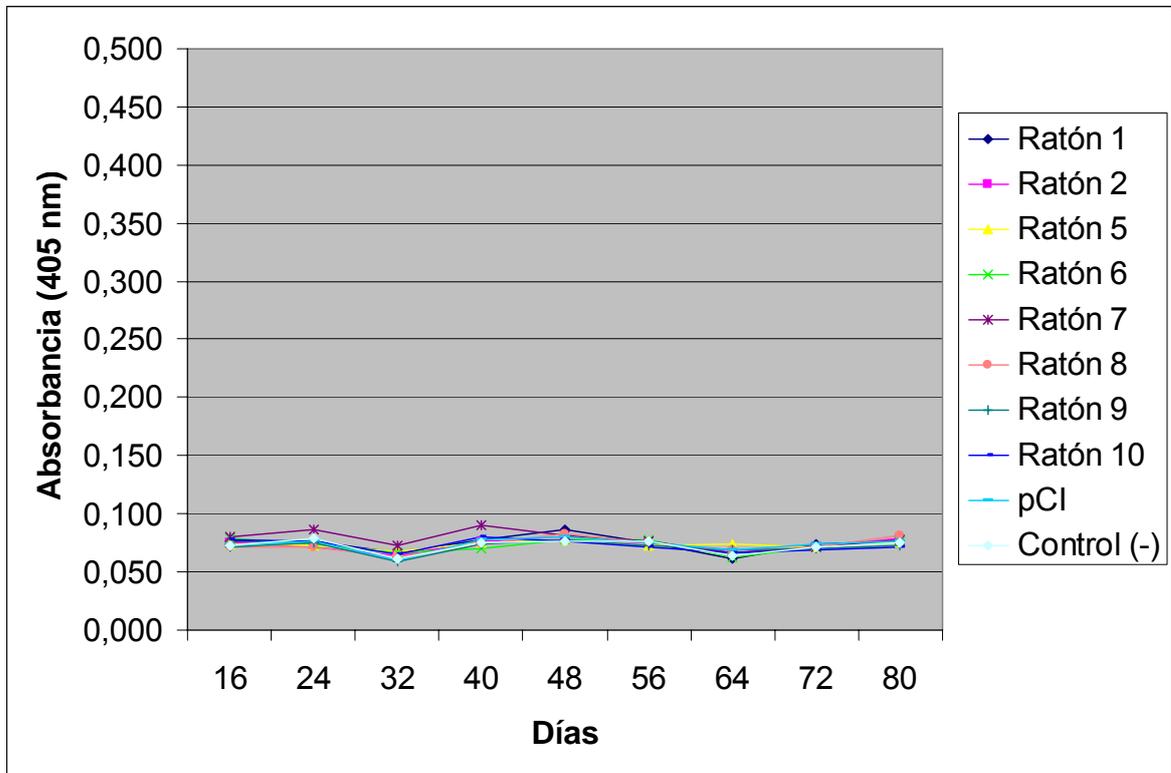


Figura 5.3. Determinación del nivel de anticuerpos generados en ratones inmunizados con el plásmido recombinante pCI-SP que contiene el ADNc que codifica para una serina proteasa de *Lachesis stenophrys* por un periodo de 80 días. La figura anterior muestra los resultados correspondientes al suero extraído por cada ratón y diluido 1/300 durante el tiempo de inmunización respectivo.

5.4 Subclonaje de serina proteasa de *B. asper* en pVAX1

Las minipreparaciones por método manual de la cepa XL1-Blue pVAX1-UbC-GFPuv de *Escherichia coli* permitieron extraer el ADN de bajo peso molecular, que corresponde a los plásmidos (pVAX1-UbC-GFPuv) empleados en el subclonaje. Asimismo, las minipreparaciones de XL1-Blue pCI-SP (*B. asper*) de *Escherichia coli* proporcionaron los plásmidos, a partir de los cuales se realizaron las amplificaciones de las secuencias codificantes (ADNc) para la serina proteasa del veneno de *Bothrops asper*. La obtención de los dos tipos de plásmidos fue chequeada a través de un gel de agarosa al 1% (100 V y 150 mA), determinándose un tamaño aproximado de 4000 pb para el caso de pVAX1-UbC-GFPuv y para el plásmido pCI-SP *B. asper*, esto de acuerdo con el marcador de peso molecular utilizado (MassRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas, USA), tal y como se muestra en la figura 5.4.

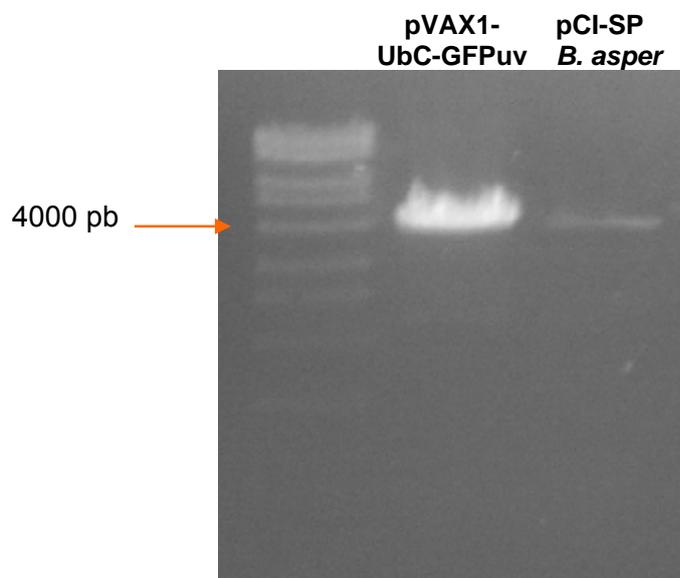


Figura 5.4. Determinación del tamaño aproximado en pares de bases de los plásmido pVAX1-UbC-GFPuv y pCI-SP (*B. asper*).

Los productos de PCR, correspondientes a los ADNc codificantes para la serina proteasa de *Bothrops asper*, revelaron un peso de aproximadamente 800 pares de bases (ver Figura 5.5) según el marcador de peso molecular empleado (MassRuler™ DNA Ladder Mix, Fermentas, USA), cuando fueron chequeados en un gel de agarosa al 1% (100 V y 150 mA), coincidiendo esto con el tamaño de la secuencia completa de nucleótidos reportada para la serina proteasa en cuestión: 780 pares de bases (Arce, 2005).

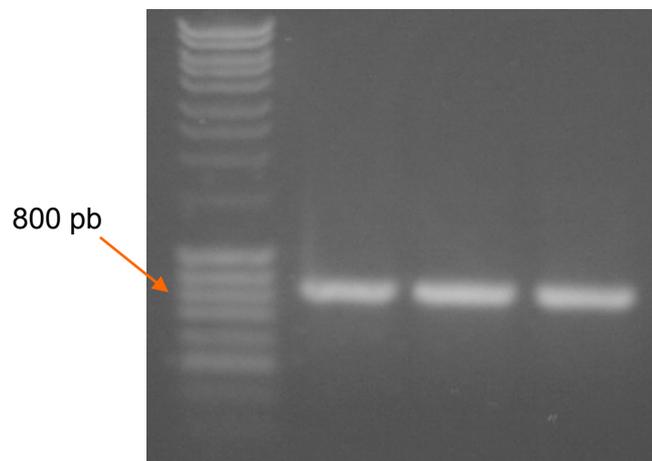


Figura 5.5. Comparación del tamaño aproximado en pares de bases del ADNc codificante para la serina proteasa de *Bothrops asper*. En los tres carriles se muestra el resultado de tres amplificaciones.

El tratamiento del vector pVAX1-UbC-GFPuv con las enzimas Hind III y EcoRI (Fermentas, USA), resultó en la eliminación de un fragmento entre 700-800 pb (Ver figura 5.6), determinado con el marcador de peso molecular MassRuler™ DNA Ladder Mix (Fermentas, USA). De esta manera, el nuevo vector (denominado pVAX1.1) presentó un tamaño cercano a 3000 pb, confirmándose así la remoción del fragmento codificante para la GFP, clonado en el vector original. En la figura 5.6, se puede observar el plásmido pVAX1-UbC-GFPuv linearizado con EcoRI (carril 1) y tratado con una doble digestión EcoRI-Hind III (carril 2), con el fin de compararlo con el plásmido resultante del tratamiento EcoRI-Hind III y posteriormente recircularizado con la ligasa T4 (Fermentas, USA). Las dos últimas bandas corresponden a pVAX1.1 linearizado con las enzimas Not I y Xba I (Fermentas, USA) respectivamente.

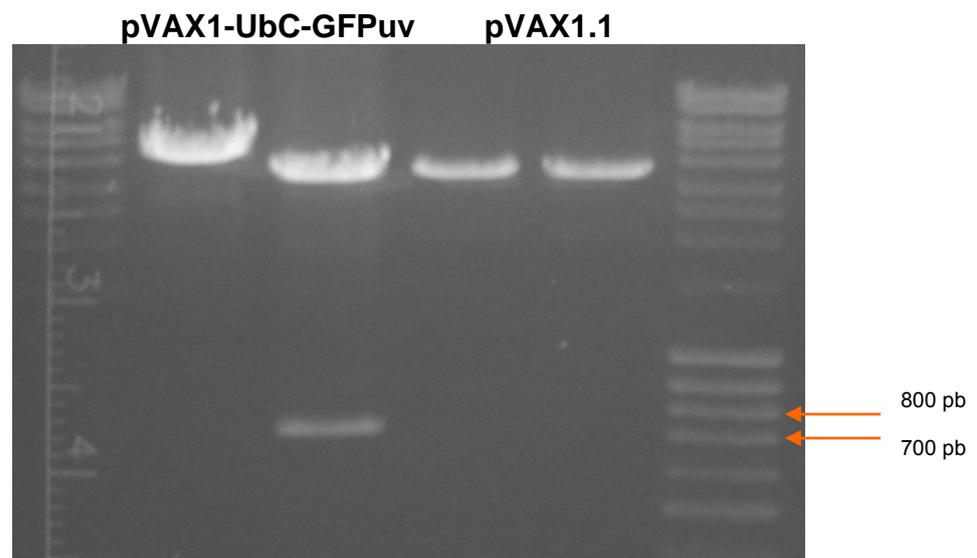


Figura 5.6 Comparación entre el plásmido pVAX1-UbC-GFPuv y el vector resultante del tratamiento con las enzimas EcoR1+Hind III (pVAX1.1).

La incorporación del ADNc codificante para la serina proteasa de *B. asper* en pVAX1.1 se comprobó a través de un análisis de digestión con enzimas de restricción, con el fin de chequear la presencia del inserto y su orientación adecuada (sentido). El análisis de restricción con las enzimas Acc I (New England Biolabs) y Hind III (Fermentas, USA) demostró la orientación correcta del inserto, al obtenerse un fragmento aproximado de 4000 pb y otro cercano a las 500 pb, esto dado que la secuencia de la serina proteasa presenta un sitio de restricción para la enzima Acc I en la posición 701, por lo tanto, al digerir el plásmido recombinante con dicha enzima en conjunto con Hind III, que presenta un sitio de corte corriente arriba del inserto dentro del sitio de clonación múltiple, se espera generar fragmentos de un tamaño similar a los mostrados en la figura 5.7.

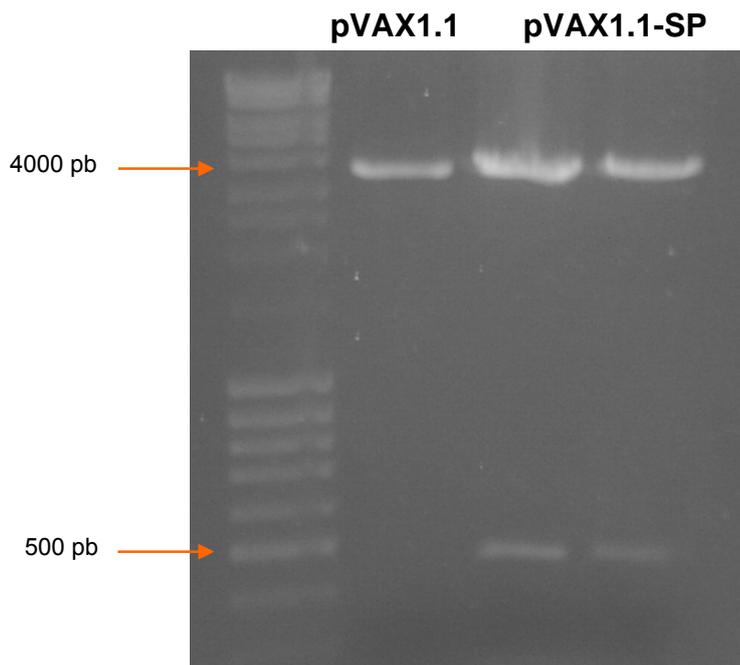


Figura 5.7. Análisis de restricción con las enzimas Acc I + Hind III para comprobar la orientación de serina proteasa de *Bothrops asper* en el vector pVAX1.1.

CAPÍTULO 6

DISCUSIÓN

La posibilidad de generar una respuesta inmune mediante la administración directa de ADN “desnudo” ha despertado todo un campo de investigación con fines terapéuticos contra diversos patógenos, parásitos y toxinas. En el caso de toxinas derivadas del veneno de ofidios, se han reportado distintas estrategias de inmunización mediante el uso de plásmidos de ADN codificando las secuencias correspondientes a la toxina completa o ciertas regiones de la misma. Toxinas como metaloproteasas (Harrison, 2004; Arce, 2005; Azofeifa, 2005), crotoquinas y serina proteasas (Arce, 2005; Azofeifa, 2005; Serrano y Maroun, 2005) han sido clonadas dentro de constructos plasmídicos con el fin de generar inmunoglobulinas capaces de neutralizar los efectos deletéreos que éstas generan tras una mordedura.

Las serina proteasas son enzimas de importancia médica dado su capacidad de activar la cascada de coagulación tras mordeduras de ofidios. Diversas bibliotecas de ADNc correspondientes a serina proteasas se han establecido para varias especies de vipéridos como *Bothrops insularis* (Junqueira-de-Azevedo y Ho, 2002), *T. stejnegeri* (Zhang *et al.*, 1997), *Akistrodon halys* (Park *et al.*, 1998), *Cerastes cerastes*, *Gloydus ussuriensis* (Yang *et al.*, 2002), *Agkistrodon contortix* (Kunes *et al.*, 2002), *Crotalus durissus durissus* (Azofeifa, 2005), *Bothrops asper* y *Lachesis stenophrys* (Arce, 2005), entre otras. La importancia de las serina proteasas se ha traducido en el interés de diseñar vacunas de ADN, empleando principalmente plásmidos bacterianos (Serrano y Maroun, 2005), esto con el objetivo final de producir sueros antiofídicos más específicos y efectivos contra el efecto de dichas enzimas.

Con respecto a las vacunas de ADN, una variedad de rutas de administración han sido estudiadas, incluyendo las vías intramuscular, intradérmica, subcutánea, intravenosa, intraperitoneal, oral, vaginal, intranasal, y más recientemente, la distribución no invasiva hacia la piel (Garmory *et al.*, 2003). Las estrategias de administración de vacunas basadas en plásmidos de ADN en ratones incluyen tradicionalmente las vías intramuscular e intradérmica, obteniéndose diferente grado de eficiencia en cuanto a la transfección y posterior expresión del plásmido involucrado. A pesar de que la selección de un vector adecuado para la expresión de insertos de ADN es de gran importancia en cualquier estrategia de inmunización, la ruta de administración de dicho vector demanda aún mayor atención, al ser ésta un factor clave para la transfección celular, y por ende, para la posterior activación de los vectores de expresión a expensas de la maquinaria celular.

La vía de inmunización intradérmica utilizando la balística (pistola génica) ha resultado en la mayoría de los casos en eficientes respuestas inmunes en comparación con la vía intramuscular, esto dado la alta capacidad de transfección celular obtenida con pocas cantidades de ADN, como consecuencia de la penetración directa de las micro-partículas de oro o tungsteno en células presentadoras de antígenos (Tang *et al.*, 1992; Fynan *et al.*, 1993) como las células de Langerhans, o bien, en queratinocitos (Raz *et al.*, 1994). Por su parte, la inyección intramuscular de plásmidos puros de ADN ha sido ampliamente usada en modelos animales desde peces hasta chimpancés; no obstante, esta ruta de inmunización puede resultar poca efectiva en animales grandes, debido a la baja eficiencia de transfección de células musculares, lo cual puede atribuirse a la compartimentalización de tejido conectivo (Gregersen, 2001).

Dado que la implementación de la balística en la distribución de plásmidos de ADN requiere equipo especializado y consumo de tiempo para preparar los llamados “cartuchos de ADN”, en este estudio se decidió probar una distribución intravenosa de plásmidos de ADN a través de la cola de ratones, esto dado la alta eficiencia de transfección reportada con los sistemas de distribución HTV (distribución hidrodinámica por la vena de la cola) y elevado título de anticuerpos específicos para antígenos que pueden ser obtenidos al cabo de 5-6 semanas de inmunización en ratones, ratas y conejos (Bates *et al.*, 2006). La tasa de inducción de anticuerpos obtenida por los sistemas de distribución HTV es similar a la reportada para la distribución de plásmidos mediante pistola génica, la cual se establece en 78% y 84% respectivamente (Chambers y Johnston, 2003), de ahí que la vía de distribución intravenosa resulta interesante como medio para obtener fuertes respuestas inmunes de una manera sencilla.

Con respecto a la distribución genética por el sistema HTV, la mayor parte de la expresión genética es encontrada en hepatocitos (pero no en células Kupffer), y en menor proporción en el bazo, pulmón y músculo cardíaco (Zhang *et al.*, 1999). De esta manera, una variedad de células directamente transfectadas podrían facilitar la presentación de antígenos al servir como células presentadoras de antígenos (APCs) facultativas; no obstante, la presentación antigénica podría darse por APCs profesionales siguiendo una transfección directa y expresión endógena del antígeno, o bien, la captura y procesamiento de antígenos producidos de forma exógena (Bates *et al.*, 2006).

La estrategia de inmunización con el plásmido recombinante pCI-SP (*L. stenophrys*) por vía intravenosa a través de la cola de ratones de la cepa CD-1 no fue eficiente para el desarrollo de una respuesta inmune positiva, esto tras analizar el nivel de anticuerpos generados durante el período de 80 días. Las lecturas de absorbancia obtenidas para cada uno de los ratones no logró diferir significativamente de los controles negativos respectivos (suero pre-inmune y suero de ratones inmunizados sólo con pCI), lo cual indica la ausencia de anticuerpos específicos para la serina proteasa del veneno de *L. stenophrys*. De todos los ratones, el número siete presentó absorbancias mayores respecto a los demás, pero no lo suficiente para considerarse una señal positiva de respuesta inmune de tipo humoral, esto demuestra cómo la respuesta inmune puede presentar variaciones aún entre individuos de una misma especie.

El ADNc codificante para la serina proteasa de *Lachesis stenophrys* había sido previamente clonado en el vector de expresión pCI (Promega, USA) que contiene el promotor/potenciador del citomegalovirus humano (CMV), el cual ha sido descrito comúnmente como un fuerte elemento regulatorio capaz de permitir altos niveles de expresión transgénica en tejidos eucariotas cuando se ha comparado con otros promotores (Garmory *et al.*, 2003). La presencia de otros elementos como la secuencia de poliadenilación SV40 (virus 40 del simio, por sus siglas en inglés) provee la estabilización de los transcritos de ARNm, de ahí que este vector en particular ha sido muy utilizado en diferentes estrategias de inmunización con ADN. A pesar de lo anterior, se establece que la expresión de diferentes secuencias de ADN correspondientes a un antígeno no resulta de manera similar en un determinado vector, lo cual ha obligado la búsqueda de alternativas para lograr una eficiente expresión antigénica y alta inmunogenicidad.

Resultados previos a este estudio, demuestran la capacidad de producir anticuerpos contra la metaloproteasa clase II del veneno de *Bothrops asper* tanto en ratones y caballos mediante inmunización intradérmica con pistola génica utilizando el vector de expresión pCI (Promega, USA), especialmente cuando se realizaba una co-inmunización del vector recombinante junto con otro plásmido que codificaba la secuencia de la interleucina 2 (en ratones) y la interleucina 6 (en caballos); no obstante, dicho patrón de inmunización no resultó positivo respecto al nivel de anticuerpos generado en ratones y caballos, al inmunizar con el ADNc codificante para la serina proteasa del veneno de *Lachesis stenophrys* (Arce, 2005). En otra investigación, Azofeifa (2005) reporta también un intento fallido para producir anticuerpos por inmunización intradérmica con pistola génica contra una serina proteasa del veneno de *Crotalus durissus durissus*, que se hallaba clonada igualmente en el plásmido pCI (Promega, USA).

La incapacidad para generar anticuerpos para ciertos antígenos puede ser el resultado de una pobre inmunogenicidad del antígeno en cuestión (Bates *et al.*, 2006), lo cual podría explicar los diferentes intentos fallidos por generar una respuesta inmune de tipo humoral cuando se establecen esquemas de inmunización con los clones de serina proteasas. La baja inmunogenicidad de ciertos antígenos lleva a la implementación de estrategias para incrementar la eficacia de las vacunas de ADN, las cuales incluyen la optimización de factores como: 1) la secuencia de ADN del vector utilizado y del transgen clonado, 2) la co-expresión de secuencias estimuladoras o citoquinas, 3) el sistema utilizado para la distribución del vector, 4) y el direccionamiento específico del vector para una apropiada estimulación inmune (Garmory *et al.*, 2003).

Por ejemplo, se ha propuesto que la adición de señales de secreción en los antígenos puede incrementar la tasa de inducción de anticuerpos (Svanholm *et al.*, 1999); sin embargo, Bates *et al.* (2006) observaron que la distribución vía HTV (distribución hidrodinámica por la vena de la cola) de vectores de expresión codificando tres diferentes proteínas de secreción no fue exitosa en la generación de anticuerpos, a pesar de lo anterior, no está claro si este resultado es propio de la naturaleza de los tres antígenos analizados, o bien, un fenómeno general para esta vía de inmunización en especial.

También se ha puesto en evidencia que la co-administración del ADN derivado del veneno de serpientes con inmunopotenciadores de la inmunización como el factor estimulante de colonias de granulocitos-macrófagos (GM-CSF, por sus siglas en inglés) y el ligando 3 tirosina kinasa similar a FMS (Flt3L, por sus siglas en inglés) podrían mejorar la respuesta inmune significativamente (Harrison *et al.*, 2000; Chambers y Johnston, 2003). La inclusión de estos factores inmunopotenciadores en un protocolo de inmunización génica por los sistemas de distribución hidrodinámica por la vena de la cola (HTV) o extremidad (HLV), también se cree que podría facilitar la respuesta inmune (Bates *et al.*, 2006).

Otra estrategia para superar la pobre inmunogenicidad de algunas proteínas fue desarrollada por Sutherland *et al.* (2001) a través de la fusión de la secuencia de ADN codificante para la región Fc de una IgG de humanos con las variantes alotípicas CD45, resultando esto en un incremento de su inmunogenicidad. Lo anterior denota la posibilidad de fusionar el ADNc codificante para una proteína de interés con la secuencia de ADN de la región Fc de una Ig foránea como mecanismo para incrementar anticuerpos específicos para proteínas inmunogénicamente pobres tales como variantes alotípicas, moléculas mutantes o moléculas altamente conservadas entre especies.

La optimización de las vacunas de ADN puede también darse en términos de elementos regulatorios de la expresión génica. Jathoul *et al.* (2004) han determinado diferencias en la expresión genética del fragmento Hc (BoNT/F) de la toxina botulínica tipo F tras emplear los promotores eucariotas CMV, CMV-TE, EF-1 α y UbC, obteniéndose altos niveles de anticuerpos específicos y buen nivel de protección contra la BoNT/F en aquellos ratones inmunizados con el constructo que incluía el promotor de la Ubiquitina C humana. Por su parte, Garmory *et al.* (2004) encontraron que aquellas vacunas de ADN que contenían el promotor CMV-TE (promotor CMV con el impulsador traduccional QB1 SP163) indujeron altas concentraciones de IgGs específicos para el antígeno V de *Yersinia pestis* en ratones, en comparación con los plásmidos de ADN que incluían los promotores CMV, UbC y EF-1 α . Promotores como los anteriores afectan la tasa de expresión de un determinado gen al regular el inicio eficiente de la transcripción, lo cual, en adición a las diferencias de expresión antigénica encontradas, sugiere que la selección de un promotor es específica para el gen en cuestión (Jathoul *et al.*, 2004).

Dentro de otros posibles factores respecto a la carencia de respuesta inmune obtenida en este trabajo, se puede mencionar problemas relacionados con la traducción de los ARNm generados a partir del ADNc codificante para la serina proteasa y el proceso de transfección previsto. La traducción de los ARNm se puede ver afectada como consecuencia de la presencia de codones no usuales en la secuencia antigénica, para los cuales exista cierta situación de déficit de ARNt en el blanco celular previamente transfectado. Dicho fenómeno es conocido como “uso selectivo de codones” y ha sido observado en todas las especies, estableciéndose por lo general una correlación entre el uso de codones selectivos y la eficiencia de expresión genética (Makoff *et al.*, 1989). En general, los organismos taxonómicamente cercanos emplean codones similares para la síntesis proteica, mientras que aquellos distantes desde un punto de vista taxonómico utilizan codones muy diferentes, de ahí que también el uso de codones en mamíferos difiere de aquel observado en microorganismos (Ikemura, 1982 y 1985).

En consecuencia, la optimización de codones de los genes, reemplazando codones extraños por otros de genes altamente expresados en el organismo en cuestión, ha resultado efectiva para incrementar la eficiencia de traducción proteica (Garmory *et al.*, 2003).

Como se mencionó anteriormente, la inmunización vía intravenosa por el sistema HTV suele transfectar hepatocitos, el bazo, los pulmones, el músculo cardíaco y APCs profesionales; a pesar de ello, la transfección celular, en términos generales, presenta rendimientos bajos en la mayoría de vías de inmunización, estimándose incluso que menos del 1% de las moléculas de ADN que logran penetrar el citoplasma alcanzan el núcleo (Babiuk *et al.*, 2003). Es por esta razón que se pone especial interés en la búsqueda de soluciones para superar la barrera de transfección celular. Como parte de este esfuerzo, se ha puesto atención a la implementación de adyuvantes para la inmunización con ADN, esto a pesar de la naturaleza adyuvante reconocida para el caso de vectores de tipo plásmido, debido a la presencia de motivos dinucleótidos no metilados CpG (citosina, fosfato, guanina) que representan potentes estimuladores de varios tipos de células inmunes, comparándose su modo de acción con el adyuvante tradicional Freund (Greguersen, 2001), activando directamente células B, asesinas naturales (NK, por sus siglas en inglés), dendríticas y macrófagos (Spitz *et al.*; 2002). Dentro de las estrategias adyuvantes empleadas se encuentra la adición de secuencias inmunoestimuladoras (ISS, por sus siglas en inglés), que constituyen hexámeros de nucleótidos que interactúan con receptores similares a Toll y con una función independiente a su localización en el plásmido (Glenting y Wessels, 2005).

Además, se reporta la co-inoculación de plásmidos que codifican inmunopotenciadores; la asociación de ADN plasmídicos a partículas poliméricas que alcanzan un tamaño de micras: microesferas biodegradables de ácido poliláctico y coglicólico, poliDTH-carbonato (pseudopoliaminoácido) y partículas de poliestireno de alrededor de 1 μ m; y el uso de inmunomoduladores como el ubenimex (UBX), mananos (para el recubrimiento de estructuras químicas como N-t-butyl-N'-tetradecyl-3-tetradecylamino propionamida o diC14 amida) y MPL: Monofosforil lípido A, por sus siglas en inglés (Aguilar y Leal, 2000).

En resumen, muchos son los factores que pueden influir sobre el desarrollo de una respuesta inmune efectiva, como igualmente numerosas son las estrategias de optimización de los vectores de expresión (plásmidos) y de las secuencias antigénicas mismas. No obstante, aún optimizados, los antígenos por sí solos no son lo suficientemente activos para estimular respuestas de protección, por lo que pueden ser necesarias incluso combinaciones antigénicas, ya sea dentro del mismo plásmido o mediante la mezcla de diferentes plásmidos de expresión (Gregersen, 2001).

Adicionalmente, en este trabajo se desarrolló un subclonaje de una serina proteasa del veneno de *Bothrops asper* en el plásmido pVAX1-UbC-GFPuv, esto con el propósito futuro de estudiar el efecto regulatorio del promotor de la Ubiquitina C (UbC) sobre la expresión *in-vivo* de la serina proteasa en ratones, y por ende, sobre el desarrollo de una respuesta inmune positiva (IgGs específicos), pero aún más importante, capaz de neutralizar los efectos adversos desencadenados por dicha toxina.

Aunque el promotor del citomegalovirus (CMV) tradicionalmente ha sido muy empleado para la expresión de antígenos en un rango de tejidos, otro promotor como el UbC se considera también eficiente en la expresión de transgenes en un amplio rango de tejidos, ya que el gen de la ubiquitina C se encuentra altamente conservado entre eucariotas (Shorpp *et al.*, 1996).

A pesar de que los productos de PCR amplificados con los imprimadores BTXU177 y BTXL961 correspondientes para la serina proteasa incluían los sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción EcoRI-5' y Kpn I-3', la estrategia de clonación se realizó generando extremos romos en el vector pVAX1-UbC-GFPuv, esto debido a la pérdida del sitio de restricción para EcoRI durante la extracción previa del fragmento codificante para la GFP. Bajo estas condiciones la obtención de clones presentando la orientación adecuada del inserto dentro del vector se redujo tras analizar numerosos clones resultantes de varias transformaciones.

Por otro lado, la ligación de un fragmento de ADN con extremos romos en un vector plasmídico requiere tomar ciertas consideraciones. En primer lugar, el vector debe ser desfosforilado usando Fosfatasa Alcalina del Intestino de Ternero o bacterial, esto con el fin de minimizar altos "backgrounds" generados por la recircularización de vectores. Adicionalmente, se considera necesario modificar el buffer de ligación estándar para incluir polietilenglicol (esto para promover la aglomeración macromolecular) y bajas concentraciones de ATP; y finalmente, se recomienda emplear altas concentraciones de la ligasa de ADN T4 y del inserto en la reacción de ligación (Sambrook *et al.*, 1989). No obstante, la apertura, tratamiento con Nucleasa S1 y desfosforilación del plásmido efectuados previo a la reacción de ligación implicó pasos sucesivos de purificación que, terminaron disminuyendo la concentración del vector significativamente, de ahí que en algunas transformaciones se obtuvieron pocos clones, para los cuales se realizó un tamizaje con enzimas de restricción para determinar la presencia y orientación adecuada del inserto.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La inmunización con el ADNc codificante para la serina proteasa presente en el veneno de *Lachesis stenophrys* (serpiente “matabuey”) mediante el sistema de distribución HTV (distribución hidrodinámica por la vena de la cola) resultó ser un método ineficaz para generar en ratones una respuesta inmune humoral; es decir, anticuerpos específicos para la serina proteasa del ofidio en cuestión.

A pesar que los resultados reportados en otros estudios indican importantes niveles de anticuerpos generados con inmunización genética por el sistema HTV, no se puede esperar que la selección de una determinada vía de inmunización sea igualmente efectiva para cualquier antígeno, de ahí que, por ejemplo en esta vía de administración, aparentemente tan efectiva, Bates *et al.* (2006) encontrara que la producción de anticuerpos no fue exitosa cuando se trataba de antígenos secretados de la célula, al igual que la serina proteasa en cuestión; sin embargo, lo anterior no puede establecerse como posible causa de los resultados obtenidos hasta no contar con más estudios al respecto.

La poca inmunogenicidad mostrada por el constructo de ADN utilizado en la inmunización de ratones implica también la búsqueda de estrategias para mejorar su desempeño como agente antigénico capaz de potenciar una respuesta inmune positiva, especialmente por los resultados previos de inmunización intradérmica con pistola génica, donde igualmente no se logró producir anticuerpos específicos para la serina proteasa de *Lachesis stenophrys*. Dicha optimización, entre otras cosas, puede conducir a la implementación de modificaciones del vector a nivel de sus elementos regulatorios (promotores), o bien del inserto, mediante la corrección de codones o la incorporación de ciertos elementos inmunoestimuladores.

El proceso de clonación del ADNc codificante para una serina proteasa del veneno *Bothrops asper* (terciopelo) en el plásmido pVAX1-UbC-GFPuv representa un esfuerzo por optimizar la respuesta inmune, a través de la incorporación de este inserto en un vector que contiene el promotor de la Ubiquitina C, el cual ha mostrado ser eficiente en la expresión génica dentro de un amplio rango de tejidos, y por consiguiente, un importante inductor de altos niveles de anticuerpos. Igual estrategia de subclonaje debe realizarse con respecto a la serina proteasa del veneno de *L. stenophrys*, con el fin de estudiar el efecto particular del promotor UbC sobre la expresión de esta toxina, y especialmente su capacidad para inducir una respuesta humoral efectiva.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar, J.C. y Leal, M. 2000. Adyuvantes vacunales: estado actual y nuevas tendencias. ***Biotecnología Aplicada***. 17: 47-160.
- Aragón, F. y Gubensek, F. 1981. *Bothrops asper* venom from Atlantic and Pacific zones of Costa Rica. ***Toxicon*** 19(6): 797-805.
- Arce, V. 2005. Clonaje, secuenciación e inmunización con ADNc que codifican por proteasas de los venenos de *Bothrops asper* y *Lachesis stenophrys*. Tesis Msc. San José, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 91 p.
- Azofeifa, G. 2005. Clonaje y secuenciación de ADNs copia que codifican por proteasas del veneno de *Crotalus durissus durissus* y producción de anticuerpos mediante inmunización con ADN. Tesis Msc. San José, Costa Rica. Universidad de Costa Rica. 84 p.
- Babiuk L.A.; Pontarollo R.; Babiuk S.; Loehr B.; van Drunen Littel-van den Hurk S. 2003. Induction of immune responses by DNA vaccines in large animals. ***Vaccine***. 21: 649-658.
- Barrett, A.J. y Rawlings, N.D. 1995. Families and clans of serine peptidases. ***Arch. Biochem. Biophys.*** 318: 247-250.
- Bates, M. R.; Zhang, G.; Sebestyén, M.G.; Neal, Z.C.; Wolff, J.A.; Herweijer, H. 2006. Genetic immunization for antibody generation in research animals by intravenous delivery of plasmid DNA. ***BioTechniques*** 40: 199-208.
- Bolaños, R. 1972. Toxicity of Costa Rican snake venoms for the white Mouse. ***Am. J. Trop. Med. Hyg.*** 21: 360.

- Bolaños, R. 1982. Las serpientes venenosas de Centroamérica y el problema del ofidismo. Primera parte. Aspectos zoológicos, epidemiológicos y biomédicos. *Revista Costarricense de Ciencias Médicas*. 3: 165.
- Bolaños, R.; Rojas, O.; Ulloa, C.E. 1982. Aspectos biomédicos de cuatro casos de mordeduras de serpiente por *Lachesis muta* (Ophidia: Viperidae) en Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.* 30: 53.
- Bolaños, R. 1984. Serpientes, Venenos y Ofidismo en Centroamérica. Editorial Universidad de Costa Rica, San José. 136 p.
- Campell, J.A., y Lamar, W.W. 1989. The Venomous Reptiles of Latin America. Cornell University Press, Ithaca. 425 p.
- Chambers, R.S. y Johnston, S.A. 2003. High-level generation of polyclonal antibodies by genetic immunization. *Nat. Biotechnol.* 21: 1088-1092.
- Chávez, F.; Alvarado, J.; Aymerich, R.; Solórzano, A. 2000. Aspectos básicos sobre las serpientes de Costa Rica. 3ed. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología Instituto Clodomiro Picado. San José, C.R. 62 p.
- Deshimaru, M.; Ogawa, T.; Nakashima, K.; Nobuhisa, I.; Chijiwa, T.; Shimohigashi, Y.; Fukumaki, Y.; Niwa, M.; Yamashina, I.; Hattori, S.; Ohno, M. 1996. Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. *FEBS Lett.* 397: 83–88.
- Feltquate, D.; Heaney, S.; Webster, R.; Robinson, H. 1997. Different Th cell types and antibody isotypes generated by saline and GeneGun DNA immunization. *J Immunol.* 158: 2278–84.

- Fynan, E.F.; Webster, R.G.; Fuller, D.H., Haynes, J.R.; Santoro, J.C.; Robinson, H.L. 1993. DNA vaccines: protective immunizations by parental, mucosal, and gene-gun inoculations. ***Proc Natl Acad Sci USA***. 90: 11478-11482.
- Garmory, H.; Brown, K.A.; Titball, R.W. 2003. DNA vaccines: improving expression of antigens. ***Genet Vaccines Ther***. 16: 2-7.
- Garmory, H.S.; Freman, D.; Brown, K.A.; Titball, R.W. 2004. Protection against plague afforded by immunization with DNA vaccines optimized for expression of the *Yersinia pestis* V antigen. ***Vaccine*** 22: 947-57.
- Gurunathan, S.; Klinman, D.M.; Seder, R.A. 2000. DNA vaccines: immunology, application, and optimization. ***Ann. Rev. Immunol.*** 18: 927-974.
- Gutiérrez, J.M., 1995. Clinical toxicology of snake bites in Central America. In: *Handbook of Toxicology of Animal venoms and Poisons*. Meier J., White, J., eds. Boca Ratón, CRC Press, 645-665 pp.
- Gutiérrez, J.M.; Rojas, G.; Aymerich, R. 2001. El envenenamiento ofídico en Centroamérica: fisiopatología y tratamiento. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología, Instituto Clodomiro Picado. San José, C.R. 35 p.
- Glenting, J. y Wessels, S. 2005. Ensuring safety of DNA vaccines. ***Microbial Cell Factories***. 4: 26.
- Gold, B.S.; Dart, R.C.; Barish, R.A. 2002. Bites of venomous snakes. ***N. Engl J Med.*** 347(5): 347-56.
- Gregersen, J.P. 2001. DNA Vaccines. ***Naturwissenschaften***. 88: 504-513.

- Guo, Y.W.; Chang, T.Y.; Lin, K.T.; Liu, H.W.; Shih, K.C.; Cheng, S.H. 2001. Cloning and functional expression of the mucrosobin protein, a beta-fibrinogenase of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan Habu). ***Protein Exp. Purif.*** 23: 483–490.
- Hagstrom, J.E.; Hegge, J.; Zhang G.; Noble, M.; Budker, V.; Lewis, D.L.; Herweijer, H.; Wolff, J.A. 2004. A facile nonviral method for delivering genes and siRNAs to skeletal muscle of mammalian limbs. ***Mol. Ther.*** 10: 386-398.
- Halfon, S. y Craik, C.S. 1998. Introduction: serine peptidases and their clans Handbook of Proteolytic Enzymes. In: Barrett, A.J., Rawlings, N.D., Woessner, J.F. (Eds.) Academic Press, London, 3-4 pp.
- Harrison, R.A. y Bianco, A.E. 2000. DNA immunization with *Onchocerca volvulus* genes, Ov-tmy-1 and OvB20: serological and parasitological outcomes following intramuscular or GeneGun delivery in a mouse model of Onchocerciasis. ***Parasit Immunol.*** 22: 249–57.
- Harrison, R.A.; Moura-Da-Silva, A.M.; Laing, G.D.; Wu, Y.; Richards A.; Broadhead, A.; Bianco, A.E.; Theakston, R.D.G. 2000. Antibody from mice immunized with DNA encoding the carboxyl-disintegrin and cysteine-rich domain (JD9) of the haemorrhagic metalloprotease, Jararhagin, inhibits the main lethal component of viper venom. ***Clin Exp Immunol.*** 121: 358-363.
- Harrison, R.A. 2004. Development of venom toxin-specific antibodies by DNA immunisation: rationale and strategies to improve therapy of viper envenoming. ***Vaccine*** 22: 1648-1655.

- Ikemura, T. 1982. Correlation between the abundance of yeast transfer RNAs and the occurrence of the retrospective codons in protein genes. Differences in synonymous codon choice patterns of yeast and *Escherichia coli* with reference to the abundance of isoaccepting transfer RNAs. **J. Mol Biol.** 158: 573-597.
- Ikemura, T. 1985. Codon usage and tRNA content in unicellular and multicellular organisms. **Mol. Biol. Evol.** 2: 13-34.
- Itoh, N.; Tanaka, N.; Funakoshi, I.; Kawasaki, T.; Mihashi, S.; Yamashina, I. 1988. The complete nucleotide sequence of the gene for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **Nucleic Acids Res.** 16: 10377–10378.
- Jathoul, A.P.; Holley, J.L.; Garmory, H.S. 2004. Efficacy of DNA vaccines expressing the type F botulinum toxin Hc fragment using different promoters. **Vaccine** 22: 3942-3946.
- Jiao, S.; Williams, P.; Berg, R.K.; Hodgeman, B.A.; Lui, L.; Repetto G.; Wolff, J.A. 1992. Direct gene transfer into non-human primate myofibers in vivo. **Hum. Gene Ther.** 3: 21-33.
- Junqueira-de-Azevedo, I.L. y Ho, P.L. 2002. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene** 299: 279–291.
- Kunes, Y.Z.; Sanz, M.C.; Tumanova, I.; Birr, C.A.; Shi, P.Q.; Bruguera, P.; Ruiz, J.A.; Sanchez-Martinez, D. 2002. Expression and characterization of a synthetic protein C activator in *Pichia pastoris*. **Protein Expr. Purif.** 26: 406–415.
- Laloo, D. y Theakston, D. 2003. Snake Antivenoms. **J.Toxicol. Clin. Toxicol.** 41(3): 277-290.

- Liu, F.; Song, Y.; Liu, D. 1999. Hydrodynamics-based transfection in animals by systemic administration of plasmid DNA. **Gene Ther.** 6: 1258-1266.
- Maeda, M.; Satoh, S.; Suzuki, S.; Niwa, M.; Itoh, N.; Yamashina, I. 1991. Expression of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **J. Biochem.** (Tokyo) 109: 632–637.
- Malasit, P.; Warrell, D.A.; Chanthavanich, P.; Viravan, C.; Mongkolsapa, J.; Singthong, B., *et al.* 1986. Prediction, prevention and mechanism of early (anaphylactic) antivenom reactions in victims of snake bites. **Br Med J** (Clin Res Ed). 292: 17–20.
- Makoff, A.L.; Oxer, M.D.; Romanos, R.A.; Fairweather, N.F.; Ballantine, S. 1989. Expression of tetanus toxic fragment C in *E. coli*: high level expression by removing rare codons. **Nucleic Acids Res.** 17: 10191-10202.
- Pan, H.; Du, X.; Yang, G.; Zhou, Y.; Wu, X. 1999. cDNA cloning and expression of acutin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 255: 412–415.
- Park, D.; Kim, H.; Chung, K.; Kim, D.S.; Yun, Y. 1998. Expression and characterization of a novel plasminogen activator from *Agkistrodon halys* venom. **Toxicon** 36: 1807–1819.
- Parry, M.A.; Jacob, U.; Huber, R.; Wisner, A.; Bon, C.; Bode, W. 1998. The crystal structure of the novel snake venom plasminogen activator TSV-PA: a prototype structure for snake venom serine proteinases. **Structure** 6: 1195–1206.
- Raz, E.; Carson, D.A.; Parker, S.E.; Parr, T.B.; Abai, A.M.; Aichinger, G.; Gromkowski, S.H.; Singh, M.; Lew, D.; Yankaukas, M.A., Baird, S.M.; Rhodes, G.H. 1994. Intradermal gene immunizations: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses. **Proc Natl Acad Sci USA.** 91: 9519-9523.

- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Savage; J.M. 2002. *The amphibians and Reptiles of Costa Rica: a herpetofauna between two continents, between two seas*. The University of Chicago Press. 934 p.
- Serrano, S.M. y Maroun, R.C. 2005. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45: 1115-1132.
- Shorpp, M.; Jager, R.; Schnellander, K.; Schenkel, J.; Wagner, E.F.; Angel, P. 1996. The human ubiquitin C promoter directs high ubiquitous expression of transgenes in mice. *Nucleic Acid Res.* 24: 1787-1788.
- Solórzano, A. y Cerdas, L. 1989. Reproductive biology and distribution of the terciopelo, *Bothrops asper* Garman (Serpentes: Viperidae). *Rev. Biol. Trop.* 46(2): 453-462.
- Spitz, M.; Velikovsky, C.A.; Cassataro, J.; Giambartolomei, G.H. 2002. Factores adyuvantes en las vacunas de ADN. *Medicina Buenos Aires*.62: 99-102.
- Stocker, K.F. 1990. Composition of snake venoms. In: *Stocker KW, ed. Medical use of snake venom proteins*. Boca Raton, Fla.: CRC Press, 33-56 pp.
- Sutherland, R.M.; Mckenzie, B.S.; Corbett, A.J.; Brady, J.L.; Lew, A.M. 2001. Overcoming the poor immunogenicity of a protein by DNA immunization as a fusion construct. *Immunology and Cell Biology*. 79: 49-53.
- Svanholm, C.; Bandholtz, L.; Lobell, A.; Wigzell, H. 1999. Enhancement of antibody responses by DNA immunization using expression vectors mediating efficient antigen secretion. *J. Immunol.* 228: 121-130.
- Tang, D.; DeVit, M.; Johnston, S.A. 1992. Genetic immunization is a simple method for eliciting an immune response. *Nature* 356: 152-154.

- Theakston, R.D. y Reid, H.A. 1983. Development of a simple assay procedure for the characterization of snake venoms. **Bull W.H.O.** 61: 949–956.
- Warrel, D.A. 1996. Clinical features of envenoming from snake bites. In: Bon, C.; Goyffon, M. eds. Envenomings and their treatments. Lyon: Foundation Marcel Merieux. 63-76 pp.
- Weiner, D. B. y Kennedy, R.C. 1999. Genetic Vaccines. **Scientific American.** 50-57 pp.
- Wolff, J.A.; Malone, R.W.; Williams, P.; Chong, W.; Acsadi, G.; Jani, A.; Felgner, P.L. 1990. Direct gene transfer into mouse muscle in vivo. **Science.** 247: 1465-1468.
- Yang, Q.; Hu, X.J.; Xu, X.M.; An, L.J.; Yuan, X.D.; Su, Z.G. 2002. Cloning, expression and purification of gussurobin, a thrombinlike enzyme from the snake venom of *Gloydius ussuriensis*. **Acta Biochim. Biophys. Sinica** 34: 6–10.
- Zamudio, K.R. y Greene, H.W. 1997. Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): Implications for Neotropical biogeography, systematics and conservation. **Biol. J. Linn. Soc. London.** 62: 421-442.
- Zhang, Y.; Wisner, A.; Maroun, R.C.; Choumet, V.; Xiong, Y.; Bon, C. 1997. *Trimeresurus stejnegeri* snake venoms plasminogen activator Site-directed mutagenesis and molecular modeling. **J. Biol. Chem.** 272: 20531–20537.
- Zhang, G.; Budker V.; Wolff, J.A. 1999. High levels of foreign gene expression in hepatocytes after tail vein injections of naked plasmid DNA. **Hum. Gene Ther.** 10: 1735-1737.

ANEXOS

Secuencia completa de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de una serina proteasa del veneno de *Lachesis stenophrys*

A continuación se presenta la secuencia nucleotídica de una serina proteasa del veneno *L. stenophrys* clonada en el plásmido pCI, la cual presenta un marco abierto de lectura de 777 pb que codifica para un péptido de 259 aminoácidos. Además, se muestra la secuencia correspondiente al péptido señal, subrayada por una línea sencilla, y los residuos de aminoácidos que constituyen a la tríada catalítica en negrita (Histidina 65, Aspartato 111 y Serina 205).

1	ATGGTGCTGATCAGAGTGCTAGCAAACCTTCTGATACTACAGCTTTCTTACGCAC AAAA	60
	<u>M V L I R V L A N L L I L Q L S Y A Q K</u>	
61	GTCTTC TGAACGGTCATTGGAGGTGATGAATGTAACATAAATGAACATCGTTCCCTTG	120
	S S E L V I G G D E C N I N E H R S L	
121	CACTCGTGTATATCACTAGCGGTTTTCTTTGCGGTGGGACTTTGATCAACCAGCAATGGG	180
	A L V Y I T S G F L C G G T L I N Q Q W	
181	TGCTGACCGCTGCACACTGCGACAGGGGAAATATGCTCATATTCTTTGATGTGCATAGCC	240
	V L T A A H C D R G N M L I F F D V H S	
241	TAAAGGGACTAAATAAGGATGTGCAGTCAAGAGTCGCAAAGGAGAAGTTCATTTGTCCCA	300
	L K G L N K D V Q S R V A K E K F I C P	
301	ATAGGAAAAAGATGACGAAAAGGACAAGGACATCATGTTGATCAAGCTGGACAGTCCTG	360
	N R K K D D E K D K D I M L I K L D S P	
361	TTAGCAACAGTGAACACATCGCGCCTCTAAGCTTGCCTTCGAACCCTCCCAGTGTGGGCT	420
	V S N S E H I A P L S L P S N P P S V G	
421	CAGTTTGCCGTATTATGGGATGGGGCGCAATCACATCTCCTAATGTGACTTTGCCCGGTG	480
	S V C R I M G W G A I T S P N V T L P G	
481	TCCCTCATTTGTGCTAACATTAACATACTCGATTATGAGGTGTGTGCGAAAAGCTTACACAG	540
	V P H C A N I N I L D Y E V C R K A Y T	
541	GGTTGCCAGCAACAAGCAGAACATTGTGTGCAGGTATCCTGGAAGGAGGCAAAGATTCAT	600
	G L P A T S R T L C A G I L E G G K D S	
601	GTAAGGGTGACTCTGGGGGACCCCTCATCTGTAATGGACAATTCCAGGGCATTGTATCTT	660
	C K G D S G G P L I C N G Q F Q G I V S	
661	GGGGGGCGCATCCTTGTGGCCAAAGTCTTAAGCCTGGTGTCTACACCAAAGTCTTCGATT	720
	W G A H P C G Q S L K P G V Y T K V F D	
721	ATACTGAGTGGATCCAGAGCATCTTGGCAGGAAATGCAGATGCAACCTGTCCCCCGTGA	
	Y T E W I Q S I L A G N A D A T C P P *	

Fuente: Tomado de Arce, 2005.

Secuencia completa de nucleótidos y secuencia deducida de aminoácidos de una serina proteasa del veneno de *Bothrops asper*

La siguiente figura muestra la secuencia nucleotídica del ADNc clonada en el plásmido pCI, que este caso corresponde a una serina proteasa del veneno de *B. asper*. El marco abierto de lectura corresponde a 780 pb que codifican para un producto de 259 aminoácidos, mostrados debajo de la secuencia completa de nucleótidos. La secuencia del péptido señal se halla enmarcada, mientras que los residuos que constituyen la tríada catalítica se presentan en negrita (Histidina 65, Aspartato 111 y Serina 205).

```

1  atgggtgctgatcagagtgctagcaaaccttctgatactacagctttcttaegcaca a a a a g 60
   M  V  L  I  R  V  L  A  N  L  L  I  L  Q  L  S  Y  A  Q  K
61  tcttctgaaactgggtcattggagggtgatgaatgtaacataaaatgaacatcggttcccttgtt 120
   S  S  E  L  V  I  G  G  D  E  C  N  I  N  E  H  R  S  L  V
121  gtcttgttttaactccagecggttttctctgcgctgggactctgggtccaggatgaatgggtg 180
   V  L  F  N  S  S  G  F  L  C  A  G  T  L  V  Q  D  E  W  V
180  ctcactgctgcaaaactgcgacagtaaaaaatttccagatgcagcttgggtgtgcacagcaaa 240
   L  T  A  A  N  C  D  S  K  N  F  Q  M  Q  L  G  V  H  S  K
241  aaggtaactaaatgaggatgagcagacaagagacccaaggagggaagcttcatttgtgtccc 300
   K  V  L  N  E  D  E  Q  T  R  D  P  K  E  E  A  S  L  C  P
301  aataggaaaaaagatgacgaagtggacaaggacatcatgttgatcaagctggacagtcgt 360
   N  R  K  K  D  D  E  V  D  K  D  I  M  L  I  K  L  D  S  R
361  gttagcaaacagtgaacacatcgcacctctcagcttgccttccagccctcccagtggtgggc 420
   V  S  N  S  E  H  I  A  P  L  S  L  P  S  S  P  P  S  V  G
421  tcagtttggcgtatttatgggatgggggcacaatctctcctaactaaagagacttatcctgat 480
   S  V  C  R  I  M  G  W  G  T  I  S  P  T  K  E  T  Y  P  D
481  gtccctcattgtgctaacaattaacatactcgatcatgcgggtgtgtcagagcagcttatcca 540
   V  P  H  C  A  N  I  N  I  L  D  H  A  V  C  R  A  A  Y  P
541  tggcagccgggtgagcagcacaacattgtgtgacaggtatcctgcaaggaggcaagataca 600
   W  Q  P  V  S  S  T  T  L  C  A  G  I  L  Q  G  G  K  D  T
601  tgttgggggtgactctggggggaccctcatctgtaatggagaattccaggggcattgtatct 660
   C  W  G  D  S  G  G  P  L  I  C  N  G  E  F  Q  G  I  V  S
661  tgggggggcccatccttgtggccagccgcataaatcctggcgtctacaccaagggtctccgat 720
   W  G  A  H  P  C  G  Q  P  H  N  P  G  V  Y  T  K  V  S  D
721  tatactgagtggaattaagagcattattgcaggaaatacagctgcggcctgcccccatga
   Y  T  E  W  I  K  S  I  I  A  G  N  T  A  A  A  C  P  P  -

```

Fuente: Tomado de Arce, 2005.