DESARROLLO METODOLÓGICO PARA LA UTILIZACIÓN DE LA PISTOLA DE GENES EN LA INMUNIZACIÓN FRENTE AL VIRUS MAEDI VISNA EN OVINOS RASA ARAGONESA

B. González[1], L. Luján[2], S. Andrés[1], R. Reina[1], D. De Andrés[1], A. Vargas[2], J.J. Badiola[2], B. Amorena[1].

[1] CSIC-SIA. Avda. Montañana 930, 50016 Zaragoza; e Instituto de Agrobiotecnología y Recursos Naturales (CSIC-UPNA) 31006 Pamplona
[2] Departamento de Patología Animal. Facultad de Veterinaria. C/Miguel Servet 177. 50016 Zaragoza

INTRODUCCIÓN

Las vacunas ADN consisten en la introducción directa de ADN plasmídico que codifica una proteína antigénica. Ésta se expresa dentro de las células del organismo, lo que conduce a la aparición de respuestas inmunológicas intensas frente a los microorganismos que producen dicha proteína. Las respuestas inmunes incluyen no sólo la formación de anticuerpos y la activación de células T con secreción de citocinas, sino también la producción de linfocitos T citotóxicos (CTL). Entre los distintos métodos de inoculación de ADN, el método de la pistola de genes tiene importantes ventajas respecto a métodos tradicionales de vacunación con ADN (inoculación intramuscular, intradérmica y subcutánea), al requerir una menor cantidad de inóculo. Sin embargo, las condiciones de inoculación dependen de varios factores, entre otros, el grosor de la piel del animal, el cual puede variar entre especies y entre razas. Según la bibliografía reciente, se ha aplicado la pistola de genes con éxito en el mundo vegetal (1) y empieza a ampliarse su uso a animales de experimentación (2) y especies ganaderas (3). Algunas de las ventajas de esta metodología son las de: ser de aplicación rápida y versátil; ser independiente del tipo de célula diana; ser útil para expresión transitoria y fija; necesitar pequeñas cantidades de ADN; prescindir de transportadores de ADN; requerir un bajo número de células; admitir altos niveles de cotransformación; poder transferir grandes fragmentos de ADN; transportar ADN de forma directa intracelular a muchas células en el área diana; ser aplicable a transformación *in vitro* e *in vivo*; y no transportar genes o proteínas extrañas. El propósito de esta investigación es el desarrollo de la metodología de la utilización de la pistola de genes para programas de inmunización con el virus Maedi Visna (VMV) ovino en ovejas Rasa Aragonesa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Principio de la técnica. El ADN se precipita sobre partículas de oro, que son aceleradas utilizándose gas helio para su propulsión a velocidad suficiente como para penetrar en las células diana de la epidermis. Utilizando dicho método en este estudio, los antígenos codificados por el ADN plasmídico conteniendo una región genómica del VMV fueron expuestos al tejido linfoide asociado a la piel, rico en células de Langerhans presentadoras de antígenos. El procedimiento de inmunización se basó en el aplicado en la Universidad de Edimburgo (Dr. Craig Watkins, comunicación personal).

Descripción de la tecnología desarrollada. Se utilizaron plásmidos de expresión eucariótica producidos en el CNB de Madrid (CSIC, equipo del Dr. M. Esteban), que contenían el gen **env** del virus VMV (plásmido-env) y, como control, plásmidos sin el gen **env** del VMV (plásmido-lacZ). Para preparar la suspensión de ADN y oro, se añadió a 20 mg de oro (0,5 mg de oro/célula diana) 100 µl de espermidina 0,05 M y a esta mezcla, 200 µg de ADN (concentración final de ADN 10 µg/mg de oro, 5 µg/disparo). Para permitir la precipitación del ADN sobre el oro, se añadió 100 µl de cloruro cálcico 1 M y se lavó cuatro veces con etanol, para quedar el sedimento al final resuspendido en 2,4 ml (conteniendo

polivinilpirrolidona (PVP) disuelta en etanol a una concentración final de 0.05 mg/ml). Durante la preparación de la muestra, se introdujo el tubo del que se obtendrían los futuros cartuchos en la Tubing Prep Station (instrumento donde se preparan los cartuchos) y se secó por acción de un flujo de Nitrógeno durante 30 minutos. Utilizando una bomba de vacío, se inoculó la muestra por aspiración en el tubo ya seco y tras aspirar el solvente de la misma, se logró un depósito de partículas de oro homogéneamente distribuidas en las paredes del tubo mediante sucesivas rotaciones de éste con y sin flujo de nitrógeno. Tras cortar el tubo en cartuchos de idénticas dimensiones, éstos se almacenaron a 4°C con un desecador durante varias semanas hasta el inicio de las inmunizaciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para averiguar si el ADN había precipitado sobre el oro de manera correcta y si junto con el oro había sido bien distribuído por los cartuchos, se determinó su absorbancia en un espectrofotómetro utilizando cartuchos control. Para ello, se añadió TRIS-EDTA (TE) por el interior de los cartuchos 3 veces, y tras sucesivas centrifugaciones se recogió el sobrenadante que contenía el ADN. Se midió la absorbancia de cada muestra diluida a 1:35, detallándose los resultados en la Tabla 1.

Tabla 1. Absorbancia de las muestras obtenidas a partir de los cartuchos y concentración final de ADN por cartucho.

	A_{260}	A_{260}/A_{280}	Concentración (µg ADN/cartucho)
Cartuchos plásmido lacZ	0,12	1,020	6
Cartuchos plásmido-*env*	0,11	1	5,5
Plásmido lacZ	0,96	1,9	1,2
Plásmido-*env*	0,16	1,8	0,3

Según estos resultados, la proporción A_{260}/A_{280} en el contenido de los cartuchos se encuentra cercana a 1. Esta proporción se considera aceptable en el caso de los cartuchos, debido a la presencia en la muestra de restos de PVP y espermidina utilizados para la preparación de los cartuchos, si bien contrasta con la proporción observada en el ADN original (proporción A_{260}/A_{280} entre 1,8 y 1,9).

Tras la elaboración de los cartuchos, se quiso determinar al nivel histológico las consecuencias de la inmunización con pistola de genes a lo largo del tiempo. Para ello, se eligieron dos ovejas, a una de las cuales (control) se le inoculó plásmido-lacZ y a la otra, plásmido-env. Se colocaron protectores del sonido en los oídos del personal que intervino y se inmovilizaron los animales. A continuación, se rasuró una superficie de unos 70 cm^2 de las patas y se desinfectó con etanol. Tras cargar los cartuchos correspondientes en su soporte, se conectó la pistola de genes con la bomba de Helio, cuya válvula se abrió hasta alcanzar una presión de 600 psi. A continuación, se aplicó la pistola de genes directamente sobre la epidermis del animal intentando mantener un ángulo de 90° y se efectuaron los disparos, todos ellos alrededor de la misma zona.

En cada extremidad se efectuaron 5 disparos administrándose por animal un total de 20 µg de ADN por extremidad (4 µg de ADN/disparo). Las inoculaciones se realizaron 7 días, 72 h, 24 h y 2 h antes de la obtención de explantes de piel. Éstos se incluyeron en una solución de formol tamponado y posteriormente se incluyeron en parafina para su examen histológico. Tras efectuar los disparos sobre la epidermis de la oveja, se observó macroscópicamente una ligera abrasión de la piel causada por el gas a propulsión. Microscópicamente, el estudio histológico mediante la tinción de hematoxilina-eosina reveló lesiones similares en ambos animales. Como se observa en la Figura 1, el tejido obtenido a las 2 h de realizar los disparos presentaba una fuerte hemorragia en la dermis subepidérmica con

congestión y presencia de microtrombos en los vasos. A las 24 h había infiltración difusa neutrofílica de la epidermis con formación de microabscesos observándose, asimismo, una dermatitis superficial aguda que se relacionaba con la presencia de los microabscesos. En todos los casos, las lesiones se relacionaron con la presencia de micropartículas de oro (ver flechas en Figura 1). La epidermis fue regenerándose a partir de las 72 h, observándose la presencia de microabscesos cada vez más pequeños y ya en su capa más superficial. Asimismo, la inflamación dérmica fue resolviéndose y sólo se observaban algunas micropartículas de oro en la dermis. A los 7 días de realizar los disparos, la epidermis, ya sin microabscesos, estaba ligeramente engrosada (lesión conocida como hiperplasia epidérmica) sólo en algunos puntos y se observaba una ligera dermatitis perivascular. La presencia de micropartículas de oro era ya muy limitada.

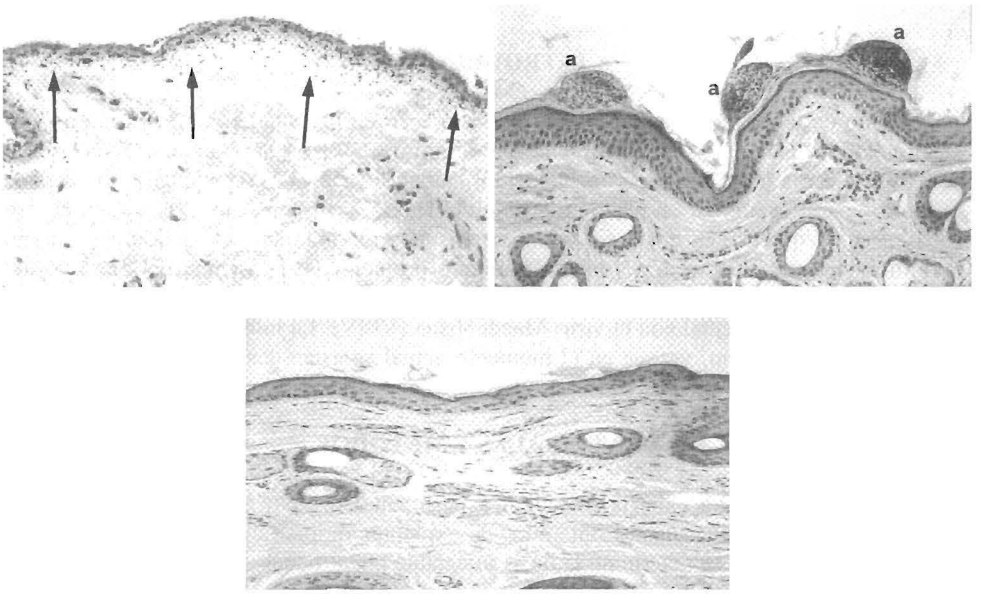


Fig. 1. Preparación histológica de la epidermis 2 h (izquierda), 72 h (derecha) y 7 días (abajo) tras someter al animal a la inmunización con pistola de genes. (Oro: →; absceso: a).

En suma, las ovejas se recuperaron con facilidad de la inmunización con pistola de genes. Este grupo de trabajo está evaluando en la actualidad una estrategia de vacunación con ADN frente al VMV utilizando la pistola de genes.

AGRADECIMIENTOS.- Nuestro especial agradecimiento al personal encargado del manejo y cuidado de los animales del Servicio de Investigación Agraria de Zaragoza (Enrique Morago, Elías Echegoyen, Fidel Lahoz y colaboradores), a los Dres. Gordon Harkiss y Craig Watkins de la Universidad de Edimburgo, por sus consejos en la utilización de la pistola de genes y al equipo del Dr. M. Esteban. Financiado por INIA (proyectos y becas sobre inmunización frente a VMV), CICYT (AGL2000-1489-C02-01 y 02) y Acción COST 834 de la unión Europea.

REFERENCIAS

1. Sanford, J.C. (1990). Physiol. Plant. 79, 206-209.
2. Johnston, S. A. et al. (1991). In Vitro Cell. Dev. Biol. 27, 11-14.
3. Karger, B. (1996). Int. J. Legal Med. 108 (4), 177-179.