



ANÁLISIS DE CABRAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE PARA LA EXPRESIÓN DE PROTEINAS RECOMBINANTES EN LA LECHE.

La información utilizada para este caso estudio con fines de capacitación, no es exactamente igual a la presentada en el expediente técnico por la entidad solicitante de autorización de seguridad biológica.

SECCIÓN I. INFORMACIÓN SOBRE EL ORGANISMO VIVO MODIFICADO

1. CABRAS MODIFICADAS GENÉTICAMENTE

1.1 Perspectiva

La obtención de Biorreactores biotecnológicos, tiene el objetivo de producir productos biológicos de mayor calidad y por métodos más simples que los convencionales (medicinas, proteínas, etc), estos han sido investigados en plantas y animales entre los que se encuentran las ovejas transgénicas que producen estas proteínas recombinantes en su leche en mayores cantidades que en los cultivos celulares convencionales.

Con este proyecto se pretende establecer la metodología y estudiar la expresión de proteínas recombinantes de interés terapéutico en leche de cabras utilizando un sistema de vectores adenovirales. Se usarán para el ensayo los genes que expresarán las proteínas obtenidas de forma recombinante que serán utilizadas como candidatos vacunales contra un virus no zoonótico, que produce una enfermedad que afecta la producción de carne en el país. Las proteínas recombinantes producidas en la leche servirán como antígenos para el desarrollo de las vacunas deseadas.

Información de la Aplicación: Esta aplicación se presenta ante el Centro Nacional de Seguridad Biológica de Cuba por parte del Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, para el ensayo confinado con cabras modificadas genéticamente utilizadas como biorreactores (8 animales), capaces de expresar la proteína recombinante en la leche. El proceso incluirá la descripción de la instalación donde se llevará a cabo el ensayo.

1.2 Características del Proceso de Transformación.

Características del vector: Sistema de vectores adenovirales (plásmido comercial), incapaz de replicación, solo capaz de transferir información genética por delección de los genes de la región E1 y E3. La recombinación de homólogos es efectuada en *E. coli*. En este sistema de vectores, el ADNc de interés, primero se clona en un vector de transferencia, el plásmido resultante se linealiza con la enzima de restricción PmeI y se cotransforma en una cepa de *E. coli* conjuntamente con el vector adenoviral, el cual contiene una parte del genoma adenoviral, pero es deficiente para los genes E1 y E3. El vector en su totalidad estará presente en la construcción final, y se introduce en la célula huésped mediante transfección de la glándula mamaria.

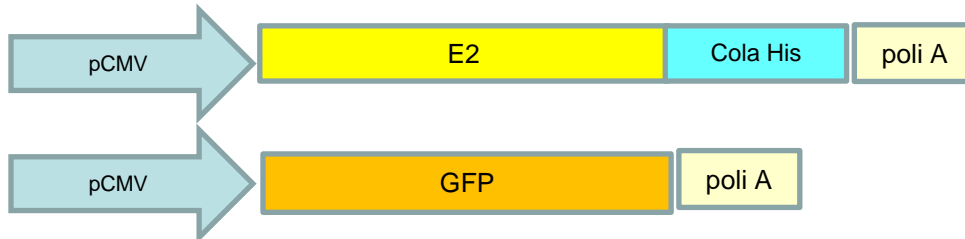
El proceso de transfección de la glándula mamaria se inicia con la inducción de la lactación en cabras mediante la administración intramuscular de hormonas. Se deben realizar enjuagues de la cisterna y la glándula mamaria con buffer con el uso de un catéter a través del canal del pezón, luego un ordeño total y proceder a la inoculación viral hasta llenar totalmente la cisterna con el inóculo en buffer. Se comienzan las colectas a partir del día 2 de inoculación y hasta el día 15 de inicio el ensayo, con ordeños una vez al día.

Vectores adenovirales: La mayoría de los adenovirus salvajes causan comúnmente enfermedad respiratoria, pero pueden ocasionar también otras enfermedades tales como gastroenteritis y conjuntivitis. Los pacientes con sistemas inmunológicos comprometidos están especialmente susceptibles

a complicaciones severas en la infección con adenovirus. Los vectores adenovirales utilizados en el ensayo son de replicación deficiente por la eliminación del gene E1, que es esencial para la replicación del virus.

Los vectores adenovirales recombinantes hechos en el laboratorio son derivados del tipo 5 de adenovirus. Las supresiones comunes en vectores adenovirales incluyen las regiones E1 y E3. La supresión E1 rinde un virus incapaz de reproducirse autónomamente y la supresión E3 hace el virus más susceptible al sistema inmune de defensa humano y proporciona también un área para la introducción del transgen. La supresión E1 es reemplazada por un cassette de expresión que consiste en un promotor, el gen de interés y una señal de poliadenilación.

El vector adenoviral en su construcción final contiene el gen que codifica para el segmento extracelular de la proteína E2 y una cola de 6 histidinas localizadas hacia el extremo c terminal. La expresión del gen de interés está controlada por el pCMV (promotor del citomegalovirus), además contiene un segundo casete de expresión para el gen de la proteína verde fluorescente, regulado también por el Pcmv. Este gen funciona como un marcador para detectar la presencia del virus mediante color verde en las células infectadas.



Los vectores adenovirales recombinantes han sido clasificados como Clase I (riesgo mínimo) y Clase II (riesgo potencialmente más alto); generalmente todos los procedimientos son realizados bajo el Nivel de Bioseguridad 2 (NSB-2), mientras los vectores de Clase II son trabajados bajo el nivel de Bioseguridad 2 con la adición de prácticas y/o equipos del Nivel de Bioseguridad 3. El nivel de contención depende del gen de interés.

Características del organismo donante: No procede exactamente por no referirse a un organismo como tal sino a un sistema de vectores, no obstante, se utiliza el Adenovirus C de humanos usados ampliamente como vectores para la transferencia de genes tanto in vitro como in vivo.

Características del organismo receptor: Cabras domésticas (*Capra hircus*).

Reino: Animalia

Filo: Chordata

Clase: Mammalia

Orden: Artiodactyla

Familia: Bovidae

Género: capra

Tipo de organismo: Mamífero, domesticado.

Centro de origen: Persia y Asia Central.

Necesidades ambientales: No es exigente a las condiciones ambientales, se debe tener especial atención a la ventilación de los alojamientos cerrados. Con aire viciado las cabras se hacen susceptibles a las enfermedades y disminuye la producción de leche.

Características del inserto:

- ADNc de la proteína verde fluorescente (GFP) por sus siglas en inglés, proveniente de la medusa *Aequorea victoria*.
- ADN cromosomal del gen que expresa la proteína recombinante de interés (proteína E2 del virus de la peste porcina clásica).

Características del animal resultante: serán cabras genéticamente modificadas con una modificación genética transitoria. La estabilidad del gen transferido dentro de la glándula mamaria y la duración de la expresión fue proporcional a la permanencia del vector dentro de las células epiteliales mamarias. Las partículas virales desaparecieron al 5to día de ordeño.

Como resultado del ensayo se obtuvieron cabras inoculadas a través de las glándulas mamarias, las cuales se indujeron a lactar o se trabajaron con ellas en lactación activa con EGTA, produciendo en su leche mg/ml de la proteína esperada. Ni el gen ni el vector se integran en el genoma hospedero, tampoco se replica el vector, por lo que la extinción de la producción de las proteínas recombinantes coincide con la del vector introducido. La proteína de interés es secretada en la leche de los animales instilados, sin que exista presencia de virus en la misma.

La expresión de transgenes a partir de vectores adenovirales generalmente se pierde aproximadamente a los 10 días, debido a la elevada respuesta inmune que se despierta contra las células infectadas a causa de la antigenicidad de las proteínas virales expresadas en dichas células.

En el expediente se expresa igualmente que la construcción genética fue realizada en un laboratorio con nivel de seguridad biológica II debido al uso del adenovirus. La transfección de la glándula mamaria de los animales se realizó en un bioterio diseñado según las características de las cabras garantizando su bienestar, y con barreras de contención para evitar el escape de las mismas al medioambiente.

El bioterio en su diseño garantiza las condiciones climatológicas, y cuenta con un sistema de tratamiento para los desechos líquidos (térmico) y sólidos, los animales una vez que concluyen el estudio son sacrificados e incinerados.

Las instalaciones para los ensayos se encuentran señalizadas con el símbolo de riesgo biológico, el nombre del ensayo, el tipo de organismo y las personas autorizadas para entrar en la instalación.

Se hace referencia a equipos de protección como ropa protectora, guantes, contenedores rígidos para el traslado de muestras, etc.

La entidad que realizó el ensayo cuenta con personal con experiencia y capacitado.

Se han documentado los procedimientos de limpieza y desinfección de las instalaciones.

Se recibió el informe con los resultados referentes a:

- Detección de adenovirus competente para replicación usando cultivos de células adecuados.
- Identificación del transgen a ser insertado dentro del vector por técnicas como Elisa, electroforesis y western blot.
- Detección del vector viral dentro del ambiente a partir de la presencia en los fluidos de experimentación: leche, orina, heces, sangre y saliva, siendo negativa en todos los casos excepto en la leche que se ubicaron cantidades hasta el décimo día.
- Transferencia de muestras de animales inoculados con el vector adenoviral para su conservación y estudio en refrigeración.

Utilización prevista: Ensayo confinado con cabras modificadas genéticamente utilizadas como bio-reactores, capaces de expresar la proteína recombinante en la leche, la meta es obtener una gran cantidad de partículas víricas con el gen de interés, sin permitir que el virus pueda ejercer ninguna propiedad patógena asociada con el virus salvaje.