



ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL
Facultad de Ingeniería Marítima Ciencias Biológicas,
Oceánicas y Recursos Naturales

**“DISEÑO DE MINIGENOMA DE VIRUS RÁBICO COMO
BASE PARA FORMULACIÓN DE VACUNAS DE
NUEVA GENERACIÓN”**

TESIS DE GRADO

Previo a la obtención del Título de:

BIÓLOGO

Presentada por:

Jaime Dario Yockteng Melgar

GUAYAQUIL – ECUADOR

Año: 2014

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial a la ESPOL, INSPI, SENESCYT y a todas las personas involucradas directa o indirectamente con el desarrollo de esta investigación.

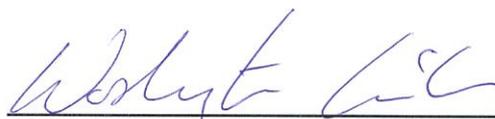
DEDICATORIA

A usted estimado lector.

TRIBUNAL DE GRADUACION



Paola Calle Delgado, Ph.D.
PRESIDENTE



Washington B. Cárdenas, Ph.D.
DIRECTOR DE TESIS



M.Sc. César Bedoya P.
Miembro Principal



Dra. Ana Chávez M.
Miembro Alterno

DECLARACIÓN EXPRESA

“La responsabilidad del contenido de esta Tesis de Grado, me corresponde exclusivamente; y el patrimonio intelectual de la misma a la ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DEL LITORAL”

(Reglamento de Graduación de la ESPOL).



Jaime Dario Yockteng Melgar

RESUMEN

La rabia es una infección vírica mortal, de enorme trascendencia para la salud pública ecuatoriana por las altas tasas de mortalidad observadas en años anteriores. Los cánidos constituyen la principal fuente de transmisión al hombre en zonas urbanas, mientras que en las zonas rurales se suman diferentes especies de animales silvestres, entre los cuales predominan los quirópteros como fuente de transmisión a otros mamíferos incluido humanos.

La rabia constituye un serio problema sanitario en razón de la alta letalidad; demanda además una considerable inversión económica y recursos humanos para actividades de control y prevención.

La importancia de estudiar este virus radica en la prevención y la elaboración de nuevas herramientas que nos permitan un mejor control de futuros brotes de la enfermedad. Con esta finalidad el presente trabajo describe la implementación de un sistema de replicación artificial del virus de la rabia, utilizando principios de genética reversa y técnicas de clonación molecular. Dicho sistema permitirá estudiar procesos biológicos e inmunológicos bajo condiciones *in vitro*.

El correcto funcionamiento del sistema artificial se comprobó mediante la expresión de un minigenoma, el cual es un ARN de menor tamaño que el genoma viral completo, pero que contiene la información genética suficiente para replicarse, proveyendo las proteínas virales necesarias paralelamente. El minigenoma se construyó reemplazando todos los genes estructurales del virus por el gen que codifica la proteína verde fluorescente (eGFP, siglas en inglés), como gen reportero. Su actividad se determinó por fluorescencia en un cultivo de células de riñón de mamífero, después de 72 horas de transfección.

Los resultados obtenidos, con sus respectivos controles, demuestran que el sistema fue exitoso al transcribir y expresar el gen reportero del minigenoma rábico. Estos resultados servirán de base para la elaboración de un genoma completo del virus de la rabia que pueda ser recuperado *in vitro*.

INDICE GENERAL

RESUMEN	V
INDICE GENERAL.....	VII
ABREVIATURAS	X
INDICE DE FIGURAS.....	XI
INDICE DE TABLAS	XIII
INTRODUCCION.....	1
CAPITULO 1: Marco Teórico	4
1.1 Situación actual e importancia en la investigación de la Rabia.....	4
1.2 Información general	7
1.2.1 Desarrollo de la enfermedad	8
1.2.2 Estructura molecular del virus	9
1.2.3 El ciclo viral	12
1.2.4 Diagnóstico de Rabia	14
1.2.5 Vacunas Antirrábica: actualidad y desafíos del futuro.....	16
1.3 Genética inversa y sistemas de rescate	19
1.3.1 Minigenomas.....	21
1.3.2 Estructura del Sistema de Rescate	22

1.4	Clonación molecular	23
1.4.1	Amplificación <i>in vitro</i>	23
1.4.2	Digestión de ADN.....	24
1.4.3	Plásmidos.....	25
1.4.4	Ligación y transformación de bacterias competentes.....	25
1.5	Secuenciación, bioinformática y filogenética.	26
CAPITULO 2: Materiales y Métodos		29
2.1	Virus, plásmidos y células.....	31
2.2	Extracción de ARN	32
2.3	Diagnóstico molecular del virus	32
2.4	Síntesis de ADNc del virus de la Rabia	33
2.5	Clonación y ensamblaje de plásmidos.....	34
2.6	Secuenciación y análisis bioinformático.....	35
2.7	Cultivo celular y transfección	36
CAPITULO 3: Resultados y Discusión.....		37
3.1	Resultados.....	37
3.1.1	Diagnóstico molecular por RT-PCR del virus de la Rabia.....	37
3.1.2	Sistema de rescate.....	39
3.1.3	Rescate minigenoma rábico: relación molar entre plásmidos.	47

3.1.4	Análisis filogenético de los genes del sistema de rescate.....	51
3.1.5	Discusión.....	60
CAPITULO 4: Conclusiones y recomendaciones.....		63
4.1	Conclusiones	63
4.2	Recomendaciones	64
ANEXOS		65
A.	Anexo: Figuras y tablas descriptivas.....	66
B.	Anexo: Protocolos.....	73
BIBLIOGRAFÍA.....		102

ABREVIATURAS

ADNc	ADN complementario
ARNc	ARN complementario (Cadena antigenómica viral)
ARNv	ARN viral (Cadena genómica viral)
BHK	Baby hamster kidney (Linea celular de riñon de hambster bebe)
CDS	coding DNA sequence (Secuencia de ADN codificante)
CVS	Challenge Virus Strain (Cepa viral de desafio)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium (Medio de cultivo)
FBS	Fetal bovine serum (Suero Fetal Bovino)
INSPI	Instituto Nacional de Investigación en Salud Publica
Ldr	Leader
MCS	Multiple cloning site (Zona multiple de clonaje)
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
RT	Reverse Transcriptase (Transcriptasa reversa)
Trl	Trail

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Reportes anuales de Rabia Humana en América Latina obtenidos del Sistema de Información Epidemiológica (SIEPI).....	6
Figura 2. Organización genómica y estructura molecular del Virus de la Rabia.	11
Figura 3. Ciclo viral de la Rabia	14
Figura 4. Estrategia de clonación “Primer Walking”	28
Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología usada durante la investigación.	30
Figura 6. Diagnóstico genético de rabia por RT-PCR.....	38
Figura 7. Diagnóstico genético de rabia por RT-PCR.	39
Figura 8. Esquema de ensamblaje del plásmido de Rescate.	42
Figura 9. Esquema de ensamblaje del plásmido pTM1-N y pTM1-P.....	44
Figura 10. Esquema de ensamblaje del plásmido pTM1-L.....	45
Figura 11. Esquema de ensamblaje del plásmido pTM1-eGFP.....	46

Figura 12. Fluorescencia durante 96horas post-transfección..	49
Figura 13. Microscopia de células BHK-21.	50
Figura 14. Árbol filogenético del gen N de cepas virales de rabia.	52
Figura 15. Árbol filogenético del gen P de cepas virales de rabia.	54
Figura 16. Árbol filogenético del gen G de cepas virales de rabia.	56
Figura 17. Árbol filogenético del gen L de cepas virales de rabia.	58
Figura 18. Plásmidos de rescate (Minigenoma).	66
Figura 19. Plásmidos auxiliares.	67

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Descripción y concentraciones de los plásmidos transfectados para el rescate del minigenoma.	48
Tabla II. Programa del termociclador para cada amplicón.	68
Tabla III. Listado de primes del presente estudio.	69
Tabla IV. Listado de secuencias utilizadas en el análisis filogenético.	71
Tabla V. Condiciones de Reacción para síntesis de ADNc	77
Tabla VI Condiciones de Reacción para PCR con enzima de alta fidelidad	79
Tabla VII Condiciones de Reacción para digestión de ADN	83
Tabla VIII Condiciones de Reacción para PCR (Screening)	88

INTRODUCCIÓN

La rabia es una enfermedad producida por un virus de ARN del orden Mononegavirales, familia *Rhabdoviridae*, género *Lyssavirus*, que afecta el sistema nervioso de mamíferos. Es un virus cosmopolita presente en todos los continentes a excepción de la Antártida y es responsable de aproximadamente 61000 muertes al año (1).

La enfermedad circula en el Ecuador, principalmente en vectores de tipo silvestre, como los Murciélagos, y es transmitida por la mordedura de un animal infectado. Debido a la mortalidad casi homogénea que presenta la rabia en personas que muestran los síntomas de la enfermedad, las autoridades de salud tanto nacionales como internacionales han fomentado estudios que generen herramientas para vigilar y combatir los brotes de la enfermedad y proteger las poblaciones en riesgo.

Con este propósito, la presente tesis describe la implementación de un sistema de replicación artificial para crear transcritos de ARN *de novo*, homólogos al virus de la Rabia denominados minigenoma. Este sistema tiene la capacidad de replicar y transcribir usando las mismas proteínas virales permitiendo estudiar los procesos biológicos e inmunológicos virales bajo condiciones *in vitro*. Para cumplir este objetivo se desarrolló los siguientes objetivos específicos:

1. Se Construyó un minigenoma Rábico con el gen reportero de la Proteína Verde Fluorescente (eGFP, siglas en inglés) flanqueado por las secuencias genéticas promotoras virales: Leader y Trailer.
2. Se clonó los genes rábicos mínimos esenciales para la replicación viral: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P) y polimerasa (L).
3. Se determinó la actividad del minigenoma en células de mamíferos por microscopía de fluorescencia.

El sistema es mediado por 5 plásmidos: 3 plásmidos auxiliares que proporcionan las proteínas mínimas infecciosas virales; 1 plásmido de rescate que transcribe el Minigenoma; y 1 plásmido que proporciona la enzima T7. Este último regula la transcripción de los otros plásmidos.

En base al conocimiento de la secuencia genética del virus se armó cada uno de los plásmidos por medio de técnicas convencionales de clonación y ADN recombinante. También se estandarizó un método de diagnóstico molecular del virus rábico para futuros ensayos en los que se requiera detectar los virus recombinantes producidos con el sistema de rescate.

La presente investigación está alineada a las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud, que en el 2010 exhortó a los países donde existe rabia a mejorar sus métodos de vigilancia, protección y prevención de la enfermedad (2).

Las técnicas empleadas en esta tesis permitirán estudiar los procesos biológicos virales *in vitro* y desarrollar nuevas vacunas con relevancia antigénica a las cepas circulantes en el país e incrementar la seguridad en el manejo del biológico, permitiendo la pronta atención a las comunidades en riesgo.

CAPITULO 1: MARCO TEÓRICO

1.1 Situación actual e importancia en la investigación de la Rabia

Vacunar a una población en riesgo contra el virus de la rabia ha demostrado ser una herramienta eficaz para prevenir y reducir la dispersión de la enfermedad. La vacuna se suministra como profilaxis pre-exposición a individuos que se consideren con un riesgo potencial de contraer la enfermedad; o tratamiento post-exposición a individuos que fueron agredidos por animales infectados.

En el Ecuador, el control de vacunación y profilaxis por parte de las autoridades de salud están en vías de eliminar la transmisión de Rabia urbana(3) (*i.e.* Rabia transmitida por perros domésticos). Sin embargo, los reservorios silvestres del virus siguen representando un riesgo para las

poblaciones rurales del país y en la última década han aumentado su incidencia en América Latina (4) (Fig. 1), especialmente la transmisión por murciélagos Hematófagos (5–7). Esto se evidenció en el Ecuador por el brote de Rabia humana silvestre ocurrido en cantón Taisha, provincia de Morona Santiago, en el 2011, con un total de 12 casos fatales (8).

A pesar de la eficiencia de la vacuna contra la rabia, esta requiere de múltiples dosis para inmunizar al organismo (9), así como una estricta cadena de frío para su transporte (10). Estos requerimientos dificultan la inmunización de poblaciones rurales, con difícil acceso logístico, por lo que se recurre a otras medidas alternativas de control silvestre como es la reducción masiva de los mamíferos considerados fuentes de la infección. Por ejemplo, en brotes de rabias transmitidos por murciélagos hematófagos se usan sustancias venenosas denominadas vampiricidas que al ser suministrada adecuadamente pueden destruir la colonia infectada de rabia.

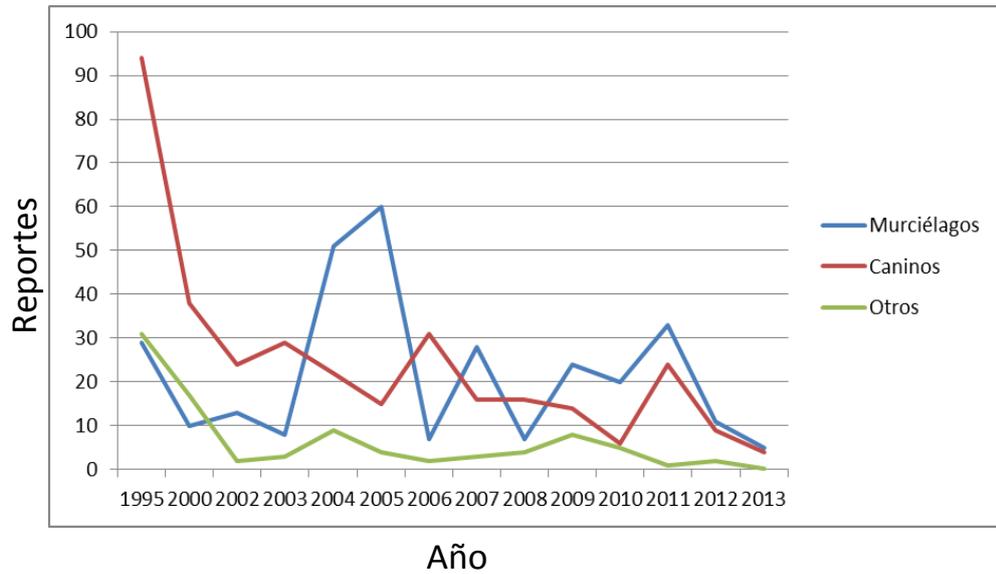


Figura 1. Reportes anuales de Rabia Humana en América Latina obtenidos del Sistema de Información Epidemiológica (SIEPI). Se observa un incremento de transmisión de Rabia atribuida a Murciélagos (Línea Azul) en la última década en comparación con el clásico vector canino (Línea Roja).

No obstante, se crea un gran problema ecológico al disminuir impredeciblemente la fauna del ecosistema, así como forzar la migración de las especies sobrevivientes y distribuir la enfermedad a nuevas zonas geográficas (11). Estos problemas crearon un interés por desarrollar mejores métodos para inmunizar los reservorios silvestres, entre los que se destaca el uso de vacunas orales suministradas en campo abierto junto con una carnada (12,13).

Los programas de vacunación oral contra la Rabia en zonas silvestres, se han presentado como una mejor opción para el control del virus en ambientes naturales (12,14–16). Estas vacunas son producidas a partir de virus recombinantes no letales como *Vaccinia* (17,18) o *Adenovirus* (19–22), que expresan la proteína antigénica del virus Rábico (*i.e.*, Glicoproteína) (23)..

La tecnología de genética inversa ha permitido crear varios virus recombinantes con genoma de ARN tales como rabia, dengue, influenza y ébola, entre otros (20,24–31). Esta tecnología se basa en la capacidad de recrear todos los aspectos de replicación y transcripción de virus de ARN desde unidades de ADN plasmídico.

1.2 Información general

La rabia es una enfermedad viral que afecta principalmente el sistema nervioso de mamíferos y ha sido reportada en todos los continentes con excepción de la Antártica (32). Una vez presentado los síntomas, la rabia tiene un alto índice de mortalidad y se estima que causa alrededor de 61000 muertes al año (1). Sin embargo, este valor puede estar subestimado, debido a que la mayor parte de los casos se producen en lugares de pocos recursos

donde usualmente no hay las herramientas adecuadas para un correcto diagnóstico y reporte de la enfermedad (33–35).

1.2.1 Desarrollo de la enfermedad

La enfermedad se desarrolla durante 5 etapas: incubación, pródromo, periodo neurológico agudo, coma y muerte (36,37).

El contagio del virus generalmente se produce por la mordedura de un animal infectado, aunque también existen casos poco comunes de transmisión por trasplante de órganos infectados y partículas virales en estado de aerosol (38,39). El periodo de incubación puede durar de 30 a 90 días, dependiendo de diversos factores como cantidad de virus inoculado, lugar de la mordedura y sistema inmune del hospedero, entre otros. Se han reportados muy pocos casos que sobrepasan el año de incubación (40).

La fase prodrómica es de corta duración (de 2 a 10 días) y con síntomas no específicos como malestar general, náuseas, fiebre, cefalea o irritación en el lugar de la mordedura. Esta fase no se presenta en todos los casos de Rabia (41).

En la fase aguda neurológica se presentan fuertes dolores de cabeza y disfunción del sistema nervioso (e.g., agitación, ansiedad, hiper-salivación, delirio, parálisis, aerofobia, hidrofobia). Dependiendo de los síntomas desarrollados la enfermedad se clasifica en 2 grupos: La rabia parálitica donde los músculos se van paralizando gradualmente hasta entrar en coma;

y la rabia furiosa que se caracteriza por presentar conducta agresiva, hidrofobia y aerofobia(42).

Las últimas etapas se presenta en estado de coma, el cual se prolonga según el tratamiento clínico pero con escasas probabilidades de mejorar (43). El coma precede en las mayorías de los casos a la muerte del organismo (44,45).

1.2.2 Estructura molecular del virus

El Virus de la Rabia (VRAB) pertenece al género *Lyssavirus*, de la familia *Rhabdoviridae*. Su morfología se asemeja a una “bala” y mide aproximadamente 45-100 nm de diámetro y 100-430 nm de longitud (46). Las 7 especies de este género son similares en su estructura y contempla 2 partes principales: la envoltura y el núcleo viral.

La envoltura viral está conformada por la membrana fosfolipídica perteneciente a la célula infectada. Debajo de la membrana se encuentra la proteína Matriz (M) que funciona de puente entre la envoltura y el núcleo viral, participando principalmente en el ensamblaje del virus (47).

Al exterior de la membrana se encuentran expuesta la Glicoproteína viral (G), que interactúa con el receptor de la célula huésped para introducir el virus por medio de endocitosis. Al momento se desconoce exactamente cuál es el receptor que participa en el ingreso viral, pero existe un claro tropismo por células nerviosas (48–51).

El núcleo consiste en el ARN viral encapsulado por varios protómeros de nucleoproteína (N), la cual permite que se doble en forma elíptica para su compactación y formar lo que se conoce como nucleocápside. Cada nucleoproteína engloba 9 ribonucleótidos (52–54). Asociada a la nucleocápside se encuentra el complejo de polimerización P-L, formado por la fosfoproteína (P) y la polimerasa (L) (55,56). La proteína L sintetiza las cadenas sentido genómico viral (- ARNv) y antisentido genómico viral (+ ARNc), dependiendo del estadio del ciclo de infección (32).

El genoma es de ARN no segmentado, de polaridad negativa, con 5 genes codificantes: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), Matriz (M), Glicoproteína (G) y Polimerasa (L). Cada gen está separado por su respectiva región intergénica (RIG) que contiene las señales para suspender la transcripción, poliadenilar e iniciar la transcripción del siguiente gen.

En los extremos del genoma se encuentran los promotores de replicación de la cadena genómica (Leader) y la cadena anti-genómica (Trail) (57) (Fig. 2). La RIG entre los genes G y L presenta un pseudogén (Ψ), de aproximadamente 600 bases y ha sido usado para modificaciones genéticas por su estabilidad al aceptar y retener genes foráneos (58).

El complejo mayor formado por el ARN viral, la nucleoproteína, fosfoproteína y polimerasa viral se denomina núcleo ribonucleoprotéico (RNP).

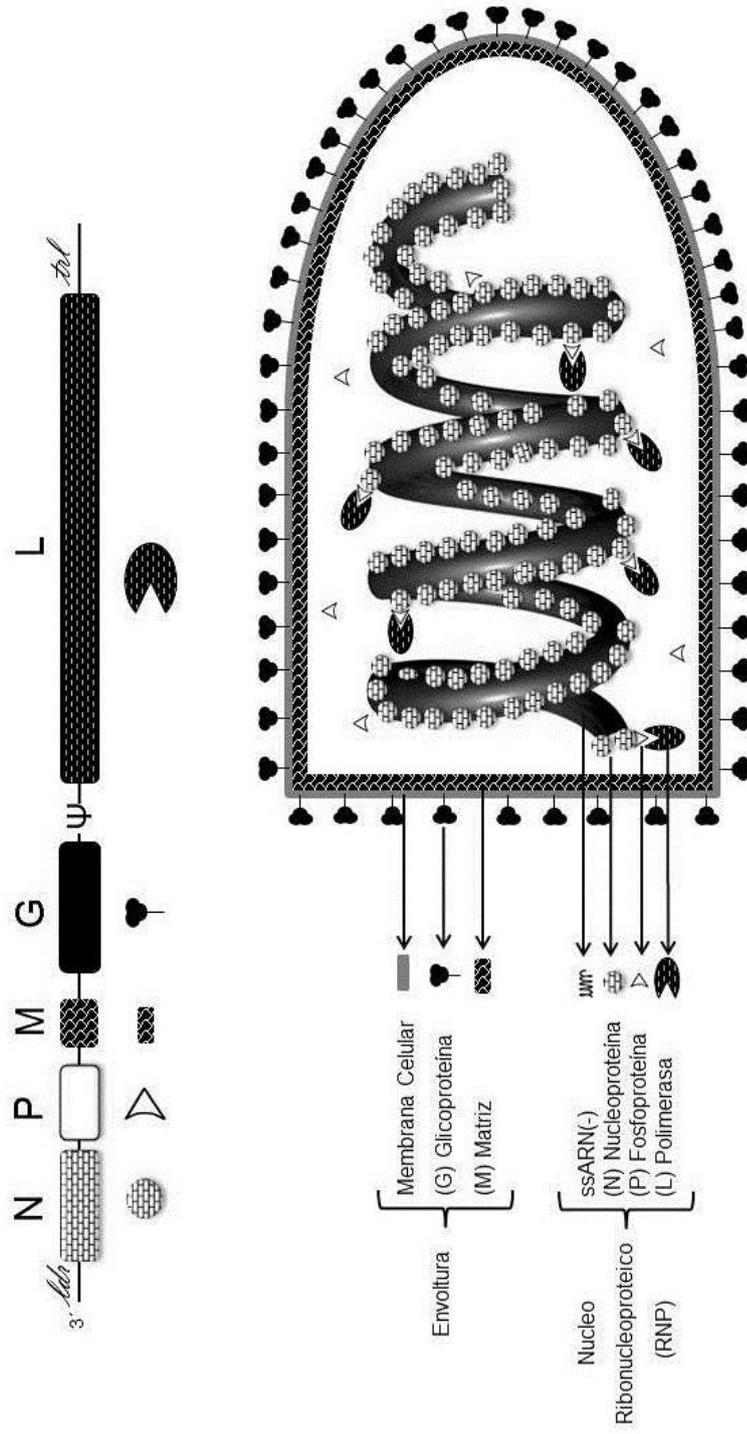


Figura 2. Organización genómica y estructura molecular del Virus de la Rabia.

1.2.3 El ciclo viral

La entrada del virus a la célula huésped se realiza por endocitosis cuando la glicoproteína expuesta en la envoltura del virus se enlaza con el receptor de la célula (Fig. 3-1). Luego, la membrana viral se fusiona con el endosoma liberando el complejo RNP en el citoplasma (Fig. 3-3).

La maquinaria viral usa como molde el ARN genómico liberado (polaridad negativa) para comenzar a transcribir un ARN corto de 55nt llamado Leader, el cuál es el único transcrito conocido sin las modificaciones de un ARNm (59,60). Luego se transcribe los 5 ARN mensajeros (ARNm) que corresponden a cada una de las proteínas virales (Fig. 3-4).

Existe un orden jerárquico de cantidad de ARNm para cada una de las proteínas, el cual dependerá de su proximidad con el extremo 3' genómico viral (61) (Fig. 2). Es decir existirá mayor cantidad de nucleoproteína transcrita que de polimerasa. Se ha comprobado que las RIG regulan la expresión de los genes (62). El complejo de polimerización hace una alto antes de comenzar la transcripción de un nuevo gen y en el 20% a 30% de los casos se disocia del ARN lo que crea una atenuación de los genes transcritos más alejados del extremo 3'.

Luego de expresar suficientes proteínas virales, el complejo de polimerización pasa de transcribir ARNm a replicar el virus completo (63,64).

La gran cantidad de Nucleoproteína soluble en el citoplasma de la célula infectada, encapsula al ARN Leader naciente durante la replicación viral y se crea una cadena completa antisentido genómico viral (ARNc), que será molde para la síntesis de nuevo ARN genómico viral (ARNv) (59) (Fig. 3-6).

La síntesis de ARNv y ARNc se produce de manera desproporcional con un radio de 49:1 respectivamente(65). Esta diferencia probablemente se deba a que la región 3' del ARNc funciona como un potenciador produciendo más ARNv que su contraparte (65).

Durante la replicación, la fosfoproteína funciona como chaperona y forma un complejo con la nucleoproteína libre, para doblar y encapsular el ARN viral a medida que se sintetiza la cadena genómica o antigenómica (66). Este complejo también evita que la nucleoproteína libre se aglutine o se asocie con ARN propios de la célula (60). La fosfoproteína recluta a la polimerasa viral libre para formar el complejo RNP.

El complejo RNP recién formado se asocia con la proteína Matriz para ensamblar el virus y migrar hacia la membrana de la célula huésped, adornada de glicoproteínas (67–69). La partícula viral naciente que egresa repite el ciclo al infectar otra célula (47).

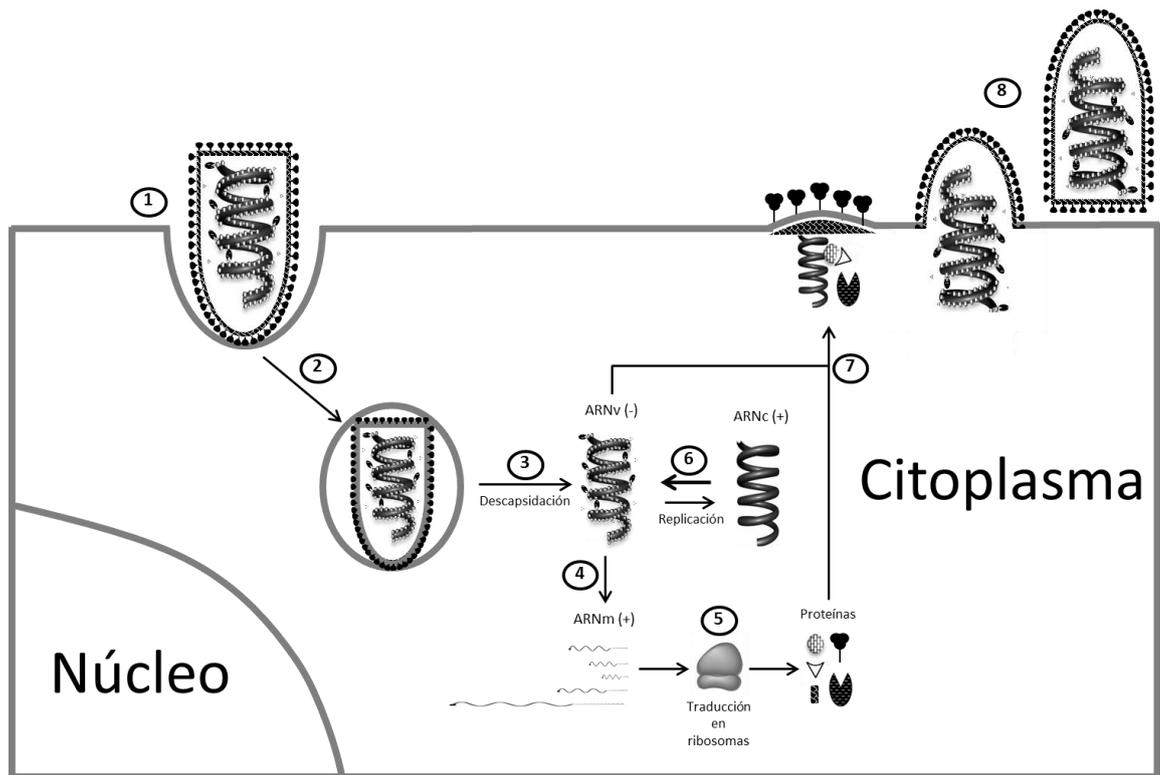


Figura 3. Ciclo viral de la Rabia

1.2.4 Diagnóstico de Rabia

Debido a la mortalidad y peligrosidad que significa un brote del virus para una población específica, es necesario un diagnóstico confiable para poder tomar las medidas adecuadas a la situación, es por esta razón que muchos laboratorios realizan varias pruebas confirmatorias antes de revelar el resultado final (70).

El diagnóstico estándar de la Rabia, sugerido por la Organización mundial de la salud (OMS), es el ensayo de anticuerpos con inmunofluorescencia (FAT

por sus siglas en inglés) y la inoculación en cerebros de ratón lactante (MIT) (71–73). A pesar de la sensibilidad y rapidez de FAT, es parte del protocolo que se realice una prueba confirmatoria mediante MIT, en los casos negativos. El ensayo por MIT requiere de un lapso de 2 a 3 semanas, un bioterio y el mantenimiento de los ratones, ensayo que puede llegar a ser muy costoso (72). Por esta razón, los MITs son generalmente usados para diagnósticos confirmatorios en casos humanos (74).

Los ensayos de FAT y MIT son usados como referencias en la mayoría de laboratorios de diagnóstico, sin embargo presentan ciertas limitaciones ya que requiere de una biopsia del material infectado, limitando su uso para estudios post-mortem. Además, cuando el tejido empieza a descomponerse la sensibilidad de los ensayos se ve seriamente comprometida (75). Para cubrir estas limitaciones se han planteado métodos alternativos al diagnóstico tradicional, donde los ensayos moleculares han adquirido bastante aceptación por la rapidez y sensibilidad de sus resultados (71,76).

Los ensayos moleculares se basan en la detección del material genético del virus. La herramienta molecular más usada es la reacción en cadena de la polimerasa junto a la transcriptasa reversa (RT-PCR, por sus siglas en inglés).

Este método combina dos técnicas: primero convierte el ARN genómico viral (ARNv) a una cadena de ADN complementaria (ADNc) por medio

transcripción reversa (RT), Luego el ADNc pasa a ser molde para la amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La sensibilidad del método va a depender de varios factores entre los que se destaca las condiciones físico-químicas de la reacción, el sitio genético amplificado, el tipo y condición de la muestra analizada (77).

En Rabia se han desarrollado diferentes protocolos de RT-PCR como diagnóstico que amplifican diferentes regiones del genoma, en su mayoría se concentran en el gen de la Nucleoproteína debido a la conservación evolutiva entre las diferentes cepas genéticas (78–81)

Debido a que se trabaja directamente con el material genético del virus, esta técnica puede dar paso a estudios que involucren el análisis filogenético y epidemiológico de la cepa circulante (79,82).

1.2.5 Vacunas Antirrábica: actualidad y desafíos del futuro.

Entre 1880 y 1885, Louis Pasteur desarrolló la primera vacuna antirrábica a partir de tejido nervioso de conejos, inactivando químicamente el virus. En ese tiempo la vacuna se consideró segura aunque luego se conocería que el método utilizado para la inactivación no era completamente eficiente y el virus podría reactivarse y generar la enfermedad (83).

Estudios posteriores realizados por Fermi (1908) y Semple (1919) mejoraron los métodos de inactivación volviendo imposible que se genere la

enfermedad por la vacunación (84). No obstante, efectos neuronales secundarios se fueron presentando debido a que se utilizaba cerebro de animal para desarrollar el virus y algunas proteínas residuales – especialmente la mielina- sobrepasaban el mecanismo de purificaciones lo que en algunos casos generaba reacciones alérgicas adversas (85).

En 1954, Fuenzalida y Palacios usaron ratones lactantes de 24 horas para la producción de vacunas con el propósito de disminuir la cantidad de mielina en el tejido. Esto disminuyó a su vez el riesgo de efectos neurológicos adversos colaterales (86) y ha sido la fórmula más usada en la vacunación tanto de humanos como animales domésticos en Latinoamérica (84).

Paralelamente, en 1958 Kissling (87) empezó a estudiar los cultivos celular in vitro como sustrato para el crecimiento viral y pruebas experimentales de diagnóstico. En este estudio se generó una cepa viral denominada “Challenge Virus Strain” (CVS), adaptada después de múltiples pasos a crecer en cultivo de células de riñón de hámster bebe (BHK-21) (87).

Estos principios fueron usados para la posterior producción de vacunas en cultivo de células diploides humanas (HDCV) y células de riñón de mono vero (88,89). Con el tiempo las vacunas de cultivo celular fueron ganando mayor relevancia por su potencia inmunogénica y ausencia de mielina en el producto final. Desde entonces la vacunas antirrábicas se han clasificado en base al sustrato utilizado en la producción; es decir si provienen de tejido

nervioso animal, como la vacuna de Fuenzalida-Palacios o de cultivo celular in vitro, como las vacunas purificadas de células vero(85).

Con las nuevas vacunas en el mercado, la mayoría de países con rabia endémica lograron reducir la enfermedad transmitida desde animales domésticos. Pero extender las vacunas a especies silvestres -vectores de la enfermedad- se convertía en algo impráctico.

En vista de este problema a finales del siglo XX surgieron las vacunas recombinantes para la inmunización de especies silvestres. Un ejemplo aprobado por la OMS es la vacuna V-RG que fue usada exitosamente en Estados Unidos y Europa para reducir la incidencia de rabia transmitida por estos vectores. Esta vacuna es producida a partir de un virus de Vaccinia que fue modificado genéticamente para no ser patógeno y expresar la glicoproteína de la rabia responsable de la inmunogénesis (17).

A este último tipo, se las puede clasificar como vacunas inteligentes debido a que son modificadas genéticamente para producir una respuesta inmune dirigida y controlada. Con esta tecnología el desafío que se tiene para el futuro es desarrollar una vacuna con una mejor resistencia a factores ambientales (e.g temperatura), una mejor respuesta inmune en una menor dosificación y con ningún efecto colateral(85).

1.3 Genética inversa y sistemas de rescate

La Genética es la ciencia que busca explicar el comportamiento de un fenotipo específico por medio de su genotipo, heredabilidad y variaciones. Tradicionalmente este fenotipo es rastreado hasta el gen causante determinando su secuencia de nucleótidos para compararlo con otros genes homólogos y buscar mutaciones, relaciones genéticas o dominios específicos que puedan explicar el comportamiento del fenotipo. A pesar de que se ha logrado identificar una gran variedad de genes, la genética tradicional no puede evaluar todas las mutaciones posibles. Esto se debe a que no todas las mutaciones están presentes naturalmente o se encuentran muy escasas y no han sido identificadas. Para poder realizar estos estudios se utilizan técnicas que corresponden al campo de la Genética inversa, termino definido porque la información (*i.e.*, De gen a fenotipo) fluye en dirección opuesta a la Genética tradicional (*i.e.*, De fenotipo a gen). La información obtenida de las técnicas de Genética inversa comienza por manipular un gen específico para estudiar el fenotipo causado por el cambio de una variable (*e.g.* mutaciones, condiciones fisiológicas, modificaciones pos-traduccionales, etc). A pesar que los objetivos de estudio de la genética tradicional y la genética reversa son opuestos, ambas áreas se complementan una a la otra (31,90).

Gracias a los avances en Genética inversa, se ha podido manipular y replicar *in vitro* virus específicos mediante una técnica conocida como “rescate viral”.

Esto ha permitido estudiar el comportamiento fisiológico viral, así como las proteínas y mecanismos que interactúan en el proceso. El virus obtenido por genética inversa se denomina virus recombinante.

Uno de los primeros rescates fue la generación de un virus de ADN infeccioso del Simian virus 40 (SV40) en 1976, el cual debido a su corto tamaño de 5500pb lo hizo un excelente candidato para generar un recombinante (91). Los primeros rescates se realizaron con virus de ADN debido a su fácil manipulación y estabilidad en el laboratorio (31).

Dos años después, se rescató el primer virus de ARN transformando un plásmido con el ADNc del bacteriófago QB en bacterias *E. coli* (92). El éxito de estos estudios dio paso al rescate de otros virus de ARN de polaridad positiva, entre los que se destaca el virus de la polio (93–103). El virus de la polio fue el primer virus que infecta a mamíferos, con gran importancia clínica y que pudo ser recuperado por técnicas de genética inversa.

Los virus de ARN de polaridad positiva coinciden estructuralmente con el ARN mensajeros de eucariotas y, como consecuencia, la transfección directa del ARN por si sola es infecciosa.

A pesar de los avances en diversos virus de ARN positivos, no fue hasta 1994 cuando el primer virus de ARN de polaridad negativa fue rescatado (104). Luego esta técnica fue adoptada para una gran variedad de virus

similares y hoy en día se cuenta con el rescate de la mayoría de representantes de las diversas familias de virus (25,26,29,31,105–110).

1.3.1 Minigenomas

El conjunto de varios componentes que permitan generar exitosamente un virus o una molécula análoga se conoce como sistema de rescate. Estos sistemas son capaces de generar clones funcionales denominados virus recombinantes y han sido ampliamente usados para generar novedosas vacunas (20,23), estudiar mecanismos de replicación e infección viral (111,112) e incluso para estudios ajenos al virus *per se* (113–117).

Sin embargo, la construcción de virus completos requiere en la mayoría de casos de mucho tiempo y de cierta experticia en las técnicas moleculares (118). Debido a esto, muchos estudios generan primero un minigenoma(112), el cual contiene todas las secuencias *cis* y *trans* necesarias para replicar y transcribir un virus, pero solo contiene un gen reportero en reemplazo de todos los genes virales. El minigenoma permite medir la actividad de replicación y transcripción bajo diferentes condiciones experimentales (119–121). A la vez, el rescate de minigenomas permite realizar modelos de replicación para estudiar el comportamiento de un gen específico en el ciclo viral (122).

Las polimerasas usadas para transcribir el ARN homólogo al virus en los sistemas de rescate añaden nucleótidos no propios a la secuencia original en

el extremo 3' y se ha demostrado que esta adición inhibe las subsiguientes replications en virus de polaridad negativa. Por esta razón se coloca una ribozima al final del transcrito del plásmido de rescate que permita generar un autocorte manteniendo íntegra la secuencia viral (123). Por el contrario, el extremo 5' puede tolerar una cierta cantidad de nucleótidos que posteriormente son corregidos durante las replications (124).

1.3.2 Estructura del Sistema de Rescate

En este estudio se ha definido 3 partes que generalmente conforman los sistemas de rescate de los mononegavirales: El plásmido de rescate, los plásmidos auxiliares, y el mecanismo de transcripción de los plásmidos.

El plásmido de rescate es responsable de transcribir el ARN viral o minigenoma. Debido a que es indispensable la integridad del ARN transcrito, se evita usar plásmidos de alto número de copias ya que la probabilidad de generar mutaciones no deseadas es mayor en estos plásmidos (125).

A diferencia de los virus de ARN positivos, que son directamente rescatados al transfectar el ARN viral, los virus de ARN negativo requieren de un proceso de replicación y transcripción mediados solo por sus proteínas virales. Por esto los sistemas de rescate para estos virus requieren de la expresión de sus proteínas en *trans* que conforman el complejo RNP (126).

Estas proteínas dentro de la célula son suministradas por lo que se conoce como plásmidos auxiliares.

Tanto el plásmido de rescate como los plásmidos auxiliares transfectados requieren ser transcritos por una polimerasa de ARN dependiente de ADN. Generalmente para los mononegavirales que tienen un ciclo de replicación exclusivo del citoplasma se usa la polimerasa T7 (127). Esta enzima es provista en *trans*, ya sea por células que han sido modificadas para expresarla continuamente (128) o por plásmidos con promotor tipo Pol II..

1.4 Clonación molecular

La clonación molecular en el contexto de esta tesis se define como el conjunto de técnicas que permiten recombinar el ADN y generar clones del mismo. Con este propósito se utilizan técnicas tradicionales que consisten en la amplificación *in vitro*, digestión de ADN, el uso de plásmidos recombinantes, ligación de bordes compatibles y la generación de clones en bacterias competentes (129).

1.4.1 Amplificación *in vitro*

Para trabajar con virus de ARN es necesario convertir la secuencia de ARN a ADN complementario (ADNc) por medio de una enzima transcriptasa

reversa (RT) y posteriormente amplificar el material genético con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La combinación de estas dos técnicas se conocen como RT-PCR (130). El producto amplificado es un ADN de doble cadena que dependerá de los primers usados para generar fragmentos de tamaño específico conocidos como “amplicón”(131).

1.4.2 Digestión de ADN

La digestión es el proceso clave para generar ADN recombinante. El ADN es cortado o “Digerido” por enzimas de restricción, las cuales reconocen una secuencia específica (Diana) y realizan un corte en la doble hebra de ADN. Esta secuencia puede ser agregada a los primers en el extremo 5’ para que sea amplificada durante la PCR y se genere la diana de digestión(132). A pesar de la gran variedad de enzimas, en esta tesis se describe únicamente las endonucleasas del tipo IIS y tipo IIP (133–135).

Las enzimas de tipo IIS –como SapI y BsmBI- se caracterizan por cortar fuera de la diana, esto es muy favorable para construir ADN recombinante que requiere mantener íntegra la secuencia original, sin agregar o dejar rastro de la diana reconocida por la enzima. Esta técnica se la conoce como corte “invisible” debido a que la secuencia digerida desaparece del producto final (136,137).

Las enzimas de tipo IIP son un grupo extenso que se caracterizan por cortar dentro de la secuencia diana y su secuencia es palindrómica de 4-8 nucleótidos de largo. Entre las enzimas más usadas de este grupo se encuentran: EcoRI, NotI, XmaI, SphI, SacI, PstI, entre otras. La mayoría de plásmidos comerciales contienen una región que agrupa varias dianas de este tipo de enzimas y se conoce como sitio de clonación múltiple (MCS Siglas en inglés), donde se inserta el ADN foráneo (138) .

1.4.3 Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN circular presentes naturalmente en las bacterias. Son usados en ingeniería genética por su cualidad de replicarse independiente del ADN cromosómico. Para este fin, el plásmido tiene que cumplir con 3 requisitos indispensables: Un MCS, donde se encuentran concentradas secuencias dianas para diferentes enzimas de restricción; una secuencia señal del origen de replicación, esta puede ser de alta o baja copia dependiendo del número de réplicas que generen; y un método de selección que permita identificar la célula hospedera que contenga el plásmido.

1.4.4 Ligación y transformación de bacterias competentes

La enzima ligasa permite unir covalentemente 2 cadenas de ADN que tengan bordes compatibles dejados por una enzima de restricción. Para que

se realice la unión de las cadenas se requiere que las moléculas de ADN afines se sobrepongan entre ellas, luego la enzima ligasa une los nucleótidos en presencia de ATP (139).

La mayoría de enzimas ligasas tienen su punto de actividad óptima a temperatura ambiente, pero la unión de las moléculas por afinidad es esporádica y se realiza mejor a baja temperatura (4°C), para disminuir la cinética de las moléculas en la reacción. La unión es el paso más deficiente, por eso usualmente se favorece este paso dejando la reacción a temperatura de 4°C por un tiempo prolongado (>12h).

En clonación molecular la ligación habitualmente corresponde a un plásmido con un inserto de ADN y el producto ligado se lo replica *in vivo* en bacterias que han sido preparadas para aceptar ADN foráneo. Este proceso se conoce como transformación y el resultado es una bacteria capaz de producir un plásmido recombinante.

1.5 Secuenciación, bioinformática y filogenética.

Tanto para la construcción genética por clonación molecular o para el diagnóstico por RT PCR, es necesario comprobar si el producto amplificado contiene la secuencia genética adecuada. Con este propósito se usa la técnica de secuenciación por el método de Sanger el cual consiste en la

amplificación usando nucleótidos modificados que terminan la reacción en los diferentes puntos donde se los adhiera, lo que permite por medio de 4 reacciones -una por cada nucleótido- determinar la secuencia de ADN en la reacción. Pero este proceso no puede abarcar secuencias mayores de 600 nucleótidos debido a que los fragmentos se vuelven muy grandes para ser separados por electroforesis y la sensibilidad de lectura se ve comprometida, es por eso que se utiliza la estrategia de secuenciación 'Primer Walking' que consiste en utilizar secuenciaciones continuas empezando con primer conocidos para luego ir creando nuevos primers en base a la información obtenida (Fig. 4). La parte teórica del método se encuentra con mejor detalle en el artículo de revisión de Lilian T. C. França (140).

Una vez determinada la secuencia genética son analizados por programas y algoritmos computarizados. El uso de las computadoras para la interpretación de datos biológicos es lo que se conoce como bioinformática. Las secuencias obtenidas son comparadas con una base de datos genéticas por medio de alineaciones de ADN que sobreponen múltiples secuencia para observar los cambios y semejanzas entre ellas(141).

Posterior a esto, se realiza análisis filogenéticos con la finalidad de observar la distancia genética entre las diferentes secuencias alineadas. Estos análisis suelen ser graficados por arboles filogenéticos para observar la relación genética en base de los cambios de nucleótidos. Los arboles están formados

por nodos y ramas las cuales simbolizan a la especie y su trayectoria evolutiva, cada agrupación genética con un mismo ancestro común se conoce como clado.

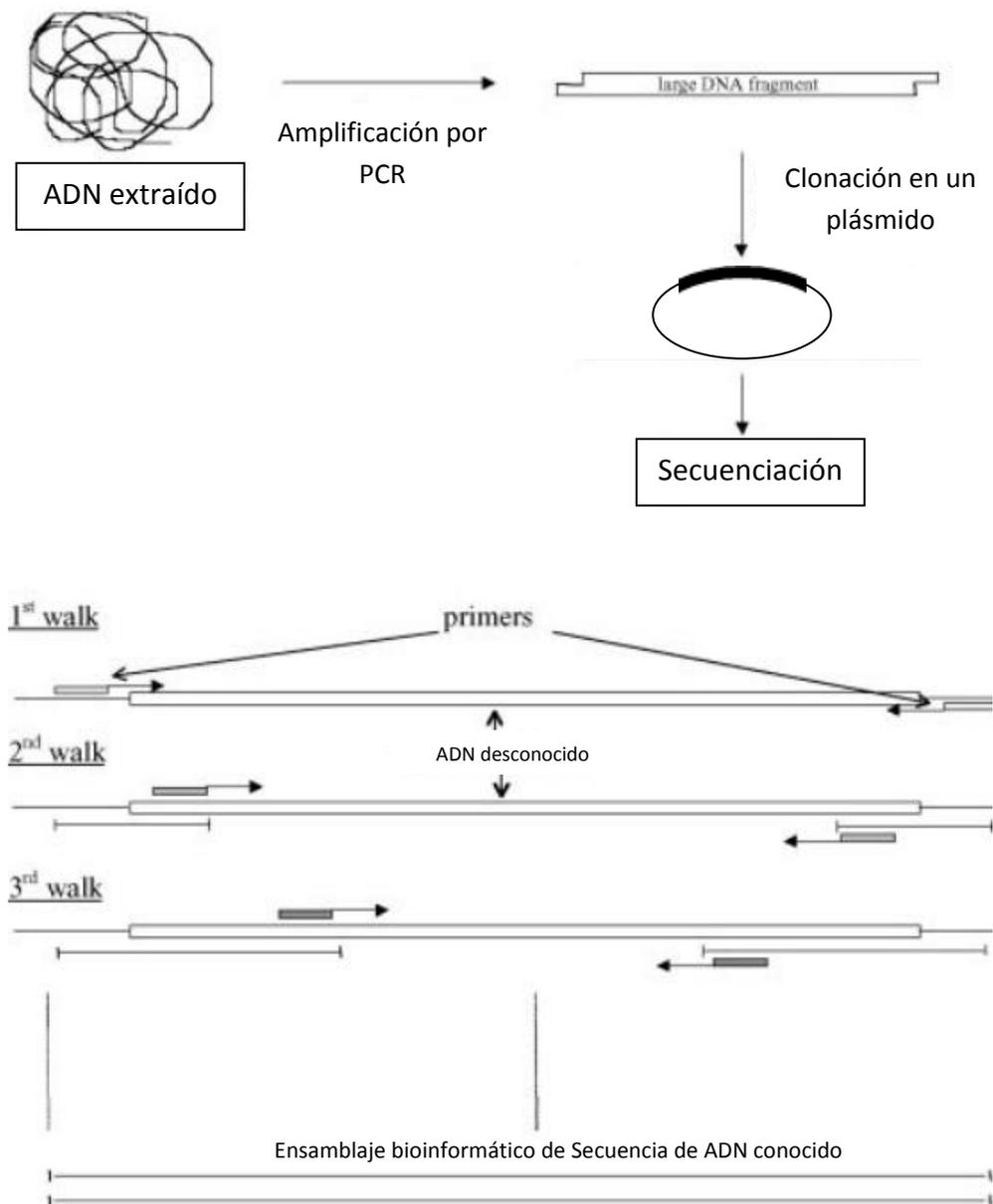


Figura 4. Estrategia de clonación “Primer Walking”. Imagen original de Lilian T. C. França(140).

CAPITULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

El proyecto de tesis se desarrolló en colaboración con el Instituto Nacional de Investigación en Salud Pública (INSPI), para que la metodología sea validada y supervisada por un ente técnico oficial del Ministerio de Salud Pública del Ecuador. Para asegurar un nivel adecuado de bioseguridad, el procesamiento de las muestra se ejecutó bajo condiciones de Bioseguridad nivel 2, que incluye el uso de una cabina de seguridad biológica y ropa protectora, así como vacunación antirrábica de pre-exposición.

Los protocolos usados están detallados paso a paso en la sección 4.4.2 de anexos para mayor información.

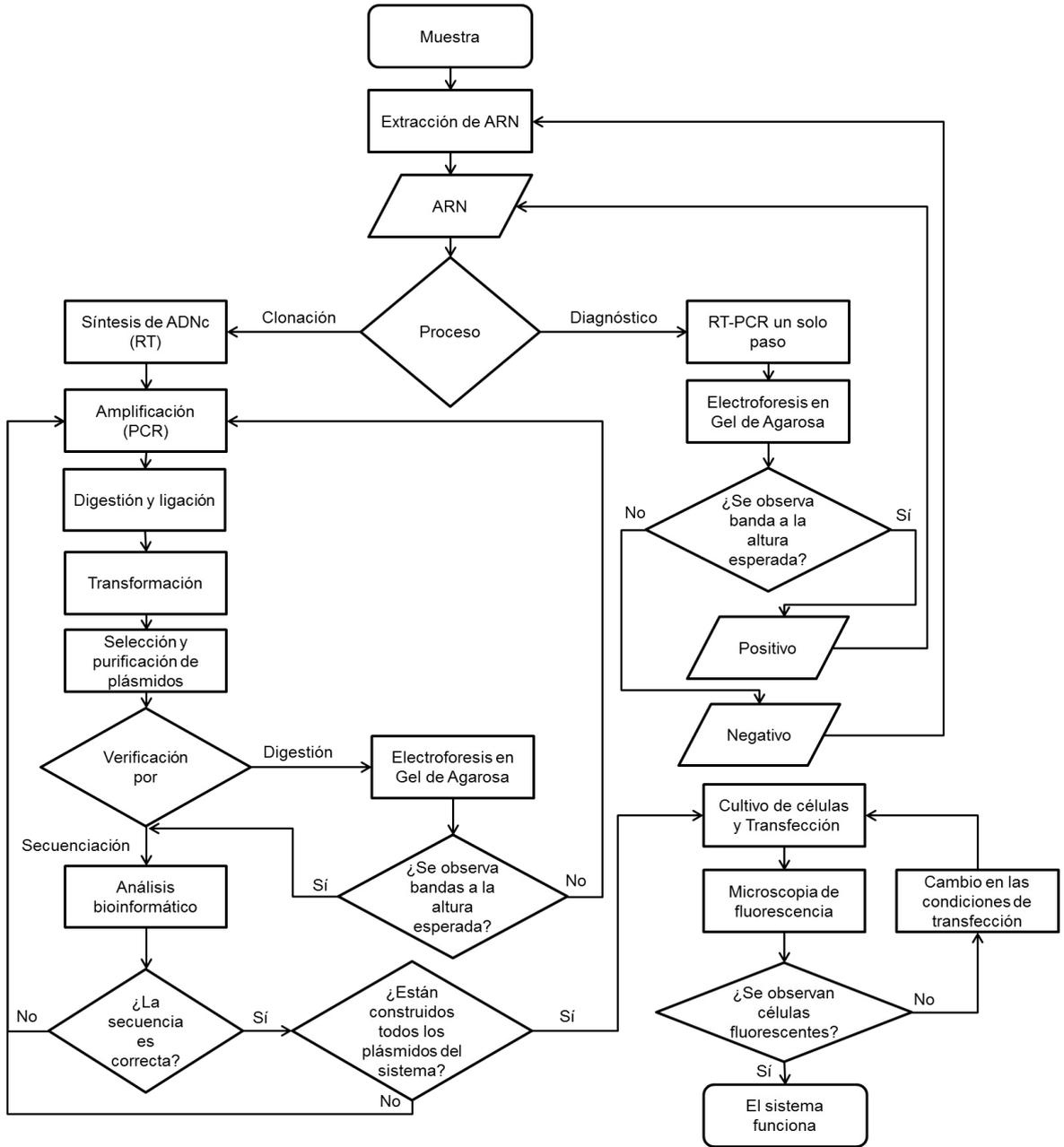


Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología usada durante la investigación.

2.1 Virus, plásmidos y células.

Se tomó como estándar de calibración el virus denominado CVS5, tanto para la amplificación de los genes en el sistema de rescate como para las pruebas de estandarización del diagnóstico molecular. Esta cepa viral es utilizada para preparar la vacuna antirrábica humana en Ecuador (142).

Cinco muestras clínicas de tejido cerebral infectadas con rabia (Fig. 7A) fueron utilizadas para probar el diagnóstico molecular. La cepa CVS5 y las 5 muestras clínicas fueron provistas cordialmente por el INSPI para el desarrollo de esta tesis.

Los plásmidos pCAGGs-T7, pM1(143) y pTM1 fueron usados en la construcción del sistema de rescate. El plásmido pCAGGs-T7 expresa la polimerasa T7 y está regido bajo el promotor de beta actina de pollo, el cual recluta la ARN polimerasa II en células eucariotas.

Los plásmidos pM1 y pTM1 contienen un MCS flanqueado por la secuencia señal T7 promotora y T7 terminador. Solo el plásmido pTM1 tiene un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES por sus siglas en inglés) entre el promotor T7 y el MCS. La estructura secundaria formada por el IRES al transcribirse cumple la función de CAP para aumentar la eficacia de traducción en células eucariotas (144), debido a que la polimerasa T7 no modifica el ARN transcrito.

Las células de riñón de hámster bebé (BHK por sus siglas en inglés) usadas en la transfección de sistema de rescate, así como los plásmidos pM1, pTM1 y pCAGGs-T7 fueron provistos cordialmente al laboratorio de Biomedicina-ESPOL por el Dr. Christopher Basler profesor del Departamento de Microbiología, Mount Sinai Hospital, New York.

2.2 Extracción de ARN

Se usó el método de Trizol-LS (INVITROGEN) para extraer el ARN viral (145). El protocolo usado (Ver Anexo) se ajustó a las especificaciones del fabricante agregando 50ul de 3M Acetato de sodio y 20ug de glicógeno a la fase acuosa para tener una mejor precipitación del ARN. El ARN fue resuspendido en un volumen total de 25ul de agua ultrapura y almacenado a -80°C.

2.3 Diagnóstico molecular del virus

El proceso de RT-PCR se lo realizó con el kit comercial SuperScriptIII One-Step RT-PCR/Platinum Taq (INVITROGEN), bajo las siguientes condiciones: Buffer de reacción 1X, MgSO₄ 3 mM, primers 0.4uM cada uno y 6ul de ARN. La reacción fue amplificada en un termociclador Veriti (Applied Biosystems, Inc) donde se incubo a 50C por 30 minutos para la síntesis de ADNc, seguido por una pre desnaturalización de 15 minutos a 95C para activar la Taq

polimerasa y posteriormente 45 ciclos: desnaturalización a 94C por 5 segundos y anillado/extensión a 60C por 1 minuto, al finalizar los 45 ciclos se le agrego 2 minutos de extensión final a 72C.

Para el diagnóstico se utilizó tres sets de primers, previamente publicados (146), y que se comprobó su identidad con varias secuencias del gen nucleoproteína depositadas datos el banco genético del National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov/). Los resultados del diagnóstico molecular fueron analizados por electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 2%, con sus respectivos controles positivos y negativos (Fig. 6C).

2.4 Síntesis de ADNc del virus de la Rabia

Con la finalidad de trabajar con el ADN complementario (ADNc) del virus de la Rabia se usó el kit “Transcriptor First Strand cDNA Synthesis” (ROCHE) que permite la transcripción reversa (*i.e.*, Conversión de ARN a ADN) por medio de una enzima ADN polimerasa y ARN dependiente.

Para la formación de un ADNc completo (Aproximadamente 12kb) se usó el cebador LdrBsmBI (Tabla II.), el cual que se anilla en el extremo 3' de la cadena genómica viral (-). El ADNc formado se usó como molde para la amplificación de todos los genes.

Las condiciones de la reacción fue establecida siguiendo las recomendaciones del fabricante 2uM Primer, 1X Reaction Buffer (8mM MgCl₂), 20U de Protector RNase Inhibitor, 1mM de dNTPs, 10U de Transcritor Reverse Trancriptase en un volumen final de 20ul. La cantidad de ARN usado fue establecido empíricamente a 8ul por reacción (Datos no mostrados).

2.5 Clonación y ensamblaje de plásmidos

Se amplificó por medio de PCR el ADNc del virus de la rabia utilizando la enzima Platinum® Pfx DNA Polymerase (INVITROGEN) bajo las condiciones recomendadas por el fabricante: 1X PCR buffer, 1mM MgSO₄, 0.3mM dNTP mix, 0.3uM primer mix. El programa del termociclador esta detallado en la Tabla.2 para cada amplicón.

En el último paso de extensión final se agregaron 0.2U de Platinum® Taq DNA Polymerase a cada reacción para agregar Adeninas a los extremos 3' y pueda ser insertado en el plásmido de transporte pGEM-T (PROMEGA), por la técnica de clonación T/A (147). Los amplicones fueron revelados en un gel de agarosa al 1% y purificado con el kit High Pure PCR Product Purification (ROCHE).

El producto purificado fue sujeto a las digestiones respectivas usando entre 1-5 unidades de enzima por reacción a 37C por 1 hora. Las enzimas usadas para cada estrategia de clonación están detalladas en las figuras del capítulo

3.1.2. El ADN digerido fue ligado con 200 unidades de ligasa T4 (NEB), a 4°C por toda la noche.

El producto ligado fue transformado en bacterias químicamente competentes DH5 α (INVITROGEN), siguiendo el protocolo del fabricante (Ver anexo 4.4.2.7). Una vez elegida la bacteria con el plásmido adecuado, se cultivó en 3 ml de medio LB por toda la noche y se extrajo el ADN plasmídico con el kit “High Pure Plasmid Isolation” (ROCHE). La concentración y pureza del ADN plasmídico fue analizado en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Scientific).

2.6 Secuenciación y análisis bioinformático.

La secuenciación de los plásmidos usados en esta tesis fue realizada en un analizador de ADN ABI 3730xl para electroforesis capilar y detección fluorescente por la compañía privada Genewiz, Nueva Jersey – Estados Unidos.

Debido a que el marco de lectura de cada secuenciación no abarca más de 600 pares de bases se utilizó la estrategia de secuenciación “Primer walking” (Revisar sección 1.5) para cubrir todas las regiones ensambladas. Esta estrategia consiste en mandar primero a secuenciar fragmentos con primers conocidos, es decir primers que se anillen al plásmido o los mismos que se usaron para amplificar el gen, luego con la nueva información de la secuencia obtenida diseñar primers para cubrir las regiones faltantes.

Las secuencias se recibieron en formato digital .ab1 por su compatibilidad con una gran variedad de software libres para el análisis del cromatograma y los picos de secuenciación.

En este estudio se usó el software Geneious 5.6 para el análisis de cromatogramas, construcción y ensamblaje de los genes. El análisis filogenético fue realizado en el software de libre acceso Mega 5. Las secuencias moldes para realizar los primers y el análisis filogenéticos fueron obtenidos a partir de la base de datos NIAID Virus Patógenos y análisis de recursos (ViPR) en línea, a través del sitio web <http://www.viprbrc>. Para el diseño de los primers se usó el software Primer3 disponible libre en internet [http://primer3.ut.ee/\(148\)](http://primer3.ut.ee/(148)).

2.7 Cultivo celular y transfección

Se cultivó la línea celular BHK-21 en frascos de 75cm² con medio DMEM más 10%FBS. No se agregó ningún tipo de antibiótico o antimicótico al medio ya que la adecuada práctica y cuidados necesarios durante los procesos deberían ser suficientes para mantener el cultivo libre de contaminación, y en el caso de no ser así poder detectar rápidamente si existe un problema.

La transfección se la realizo en células BHK-21 siguiendo el protocolo adaptado de Martinez-Sobrido *et al.* (Ver Anexo B.13)(24), en placas de 6 pocillos para cultivo celular. Al tercer día pos-transfección se analizaron las células en un microscopio de fluorescencia Motic AE31.

CAPITULO 3: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1 Resultados

3.1.1 Diagnóstico molecular por RT-PCR del virus de la Rabia.

Con el propósito de abarcar la variabilidad genética del virus se utilizaron 3 juegos diferentes de primers previamente publicados y que resultaron positivos con el estándar de calibración CVS-5 (146). Los resultados fueron revelados en gel de agarosa al 2% con sus respectivos controles negativos para descartar cualquier contaminación durante el proceso (Fig. 6).

Luego, el protocolo fue probado con 5 muestras clínicas provenientes del brote de rabia del 2011 y diagnosticadas positivas por FAT. Las 5 muestras

fueron analizadas solo con el set de primer #2. Los resultados corroboraron en 100% con los obtenidos por los métodos serológicos tradicionales (Fig. 7).

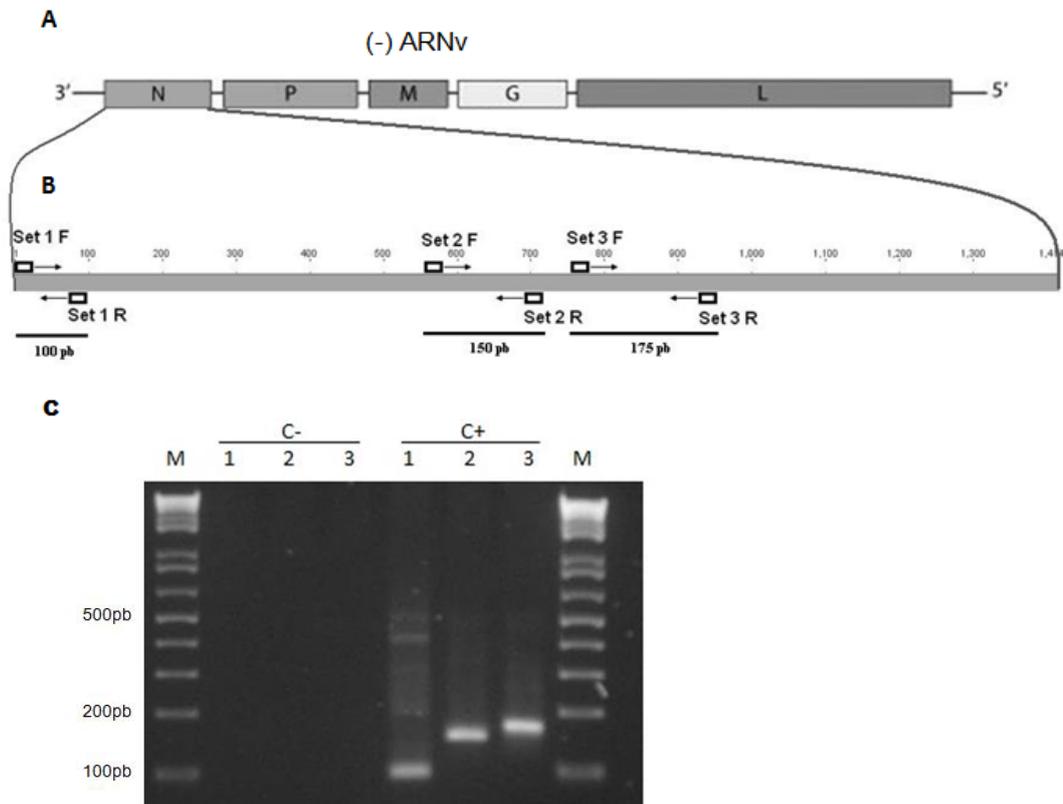


Figura 6. Diagnóstico genético de rabia por RT-PCR

A) Esquema de la organización genética del virus de la rabia. **B)** Ubicación de las regiones conservadas de la nucleoproteína viral, reconocidas por cada uno de los tres sets de primers utilizados en el diagnóstico molecular de virus rábico. **C)** Gel de Agarosa al 2% para el diagnóstico del control positivo CVS-5 (C+) con su respectivo control negativo (C-) para descartar contaminación. El control negativo es una muestra de agua ultrapura la cual fue sometida al proceso de extracción y RT-PCR. Los códigos 1, 2 y 3 corresponden a los 3 juegos de primers usados para el diagnóstico respectivamente.

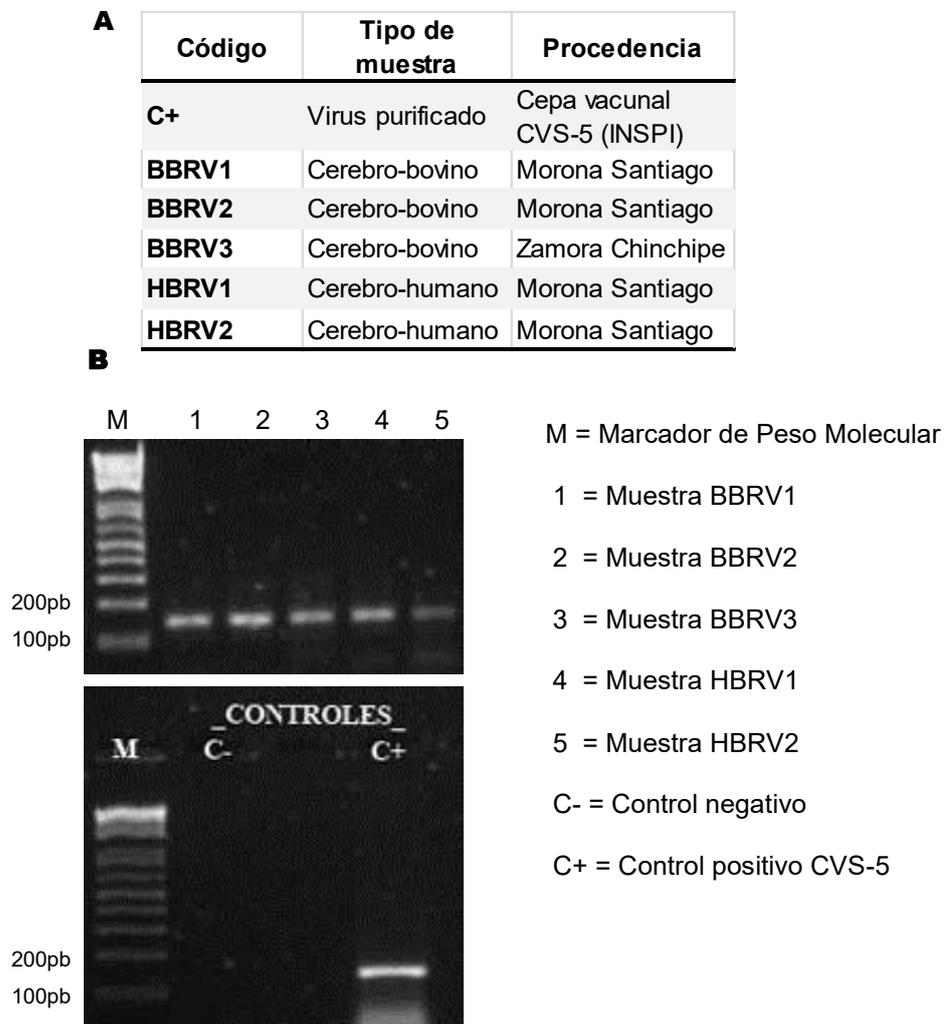


Figura 7. Diagnóstico genético de rabia por RT-PCR.

A) Descripción de las muestras analizadas **B)** Gel de Agarosa al 2% mostrando los amplicones de set 2 de diagnóstico (150pb): BBRV1 (1), BBRV2 (2), BBRV3 (3), HBRV1 (4), HBRV2 (5) y sus respectivos controles positivo CVS-5 (C+) y negativo (C-). El control negativo es una muestra de agua ultrapura, la cual fue sometida al proceso de extracción y RT-PCR.

(pM1-RVeGFP), los plásmidos auxiliares (pTM1-N, pTM1-P y pTM1-L) y un plásmido control (pTM1-eGFP) para verificar la expresión de la polimerasa T7 en las células transfectadas.

3.1.2.1 Plásmido de Rescate

El plásmido de baja copia pM1 (143), usado como base para la construcción del plásmido de rescate, contiene el promotor T7, la ribozima (RZ) del Virus de Hepatitis Delta (HDV) y la secuencia terminadora T7. Por medio de PCR, usando los primers “RzFpMI” y “T7RpMI” (Tabla 2), se insertaron dos sitios de restricción BsmBI entre el final de la región promotora T7 y el inicio de la RZ HDV, para clonar el minigenoma sin dejar rastros de la secuencia diana (endonucleasas clase IIS ver capítulo 1.4.2). El plásmido formado se denominó pM1-BsmBI.

Las regiones Leader y Trailer del genoma viral fueron amplificadas desde el ADNc con primers diseñados para agregar las secuencias BsmBI complementarias al plásmido con la finalidad de realizar una clonación direccionada. Los amplicones de 91pb para el fragmento Leader y 152pb del Trailer fueron purificados y clonados en un vector de transporte (Fig. 8B).

Luego los clones seleccionados se inocularon en 3 ml de medio LB y se extrajo el ADN plasmídico. El plásmido de transporte con la secuencia leader

en sentido positivo fue denominado pGEMT-Ldr(+) y el de la secuencia Trailer en sentido negativo fue denominado pGEMT-Trl(-).

Los fragmentos Leader y Trailer, retirados de sus respectivos plásmidos usando las enzimas BsmBI y SacI (Fig. 8B), fueron insertados en sentido genómico viral en el plásmido pM1. El plásmido resultante se denominó pM1-RV(-) (Fig. 6D).

Se amplificó el gen reportero de la proteína verde fluorescente (eGFP) con los primers eGFP-CATf y eGFPPr (Tabla 2), incorporando una secuencia de restricción SapI en los extremos (Fig. 8C). El amplicón de 754pb fue clonado en sentido negativo dentro del plásmido pM1-RV(-), entre la zona de inserción SapI. El plásmido final se lo denominó pM1-RVeGFP (Fig. 6E).

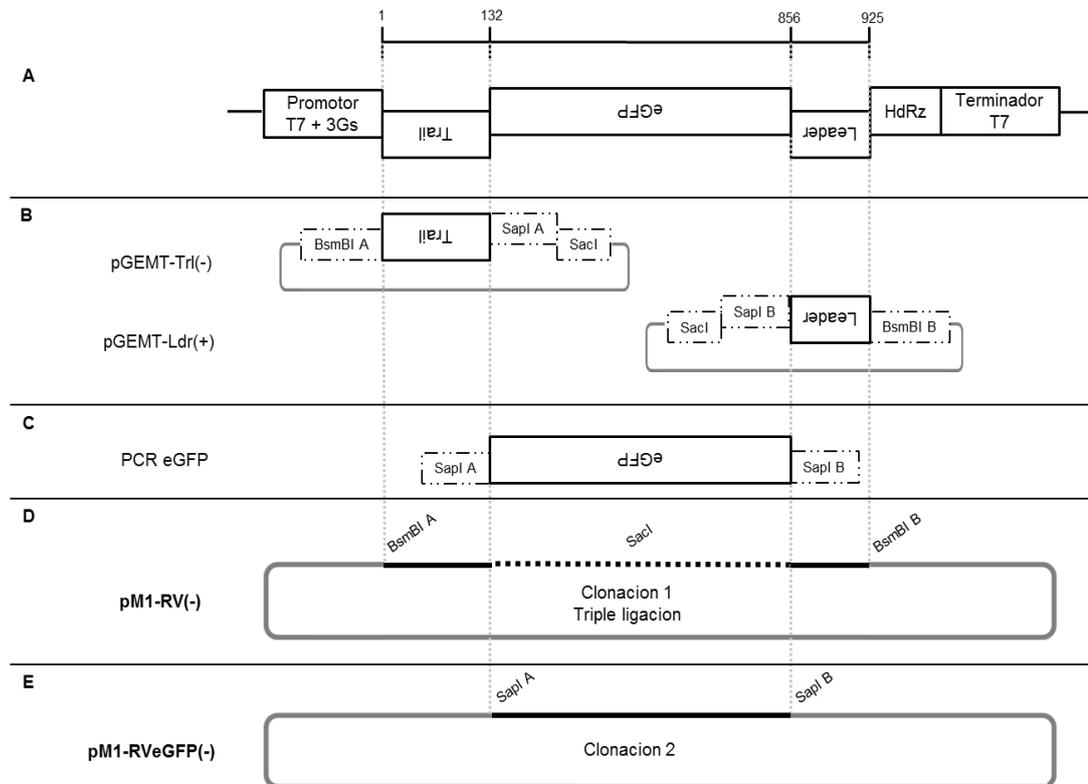


Figura 8. Esquema de ensamblaje del plásmido de Rescate.

A) Mapa de la construcción final. B) Plásmidos de transporte de los fragmentos Trailer y Leader. C) Amplificación del gen eGFP por PCR. D) Ensamblaje del plásmido pM1-RV(-): Triple clonación de los fragmentos Leader, Trailer y el plásmido pM1-BsmBI. E) Ensamblaje del plásmido de rescate pM1-RVeGFP(-): Ligación de eGFP con el plásmido pM1-RV(-).

3.1.2.2 Plásmidos Auxiliares

Para construir los plásmidos que expresan las proteínas N y P, se amplificó (ver condiciones de amplificación en Tabla 2) el gen N con los primers NCDSf y NCDSr y el gen P con los primers PCDSf y PCDSr (Tabla III.). El

tamaño de los amplicones fueron 1374pb y 914pb respectivamente. Los primers usados generaron las secuencias de restricción NotI, en el extremo 5' y PstI, en el extremo 3', para clonar directamente al plásmido pTM1 (Fig. 9). Además, el primer forward se le agregó la secuencia Kozak antes del primer nucleótido codificante.

El gen L se lo clonó en 4 subclonaciones continuas debido a su gran tamaño (6000 bases). El plásmido final se denominó pTM1-L (Fig. 10C-F).

El marco abierto de lectura de la polimerasa L fue dividido en 4 fragmentos: L1, L2, L3 y L4 (Fig. 10B). El fragmento L1, además de tener las enzimas de restricción adecuadas para la clonación, también cuenta con una región Kozak antes del primer codón de inicio. Los sitios de restricción XmaI y SphI fueron creados durante la PCR para ensamblar la polimerasa, generando una mutación silenciosa en el marco abierto de lectura (Fig. 10A).

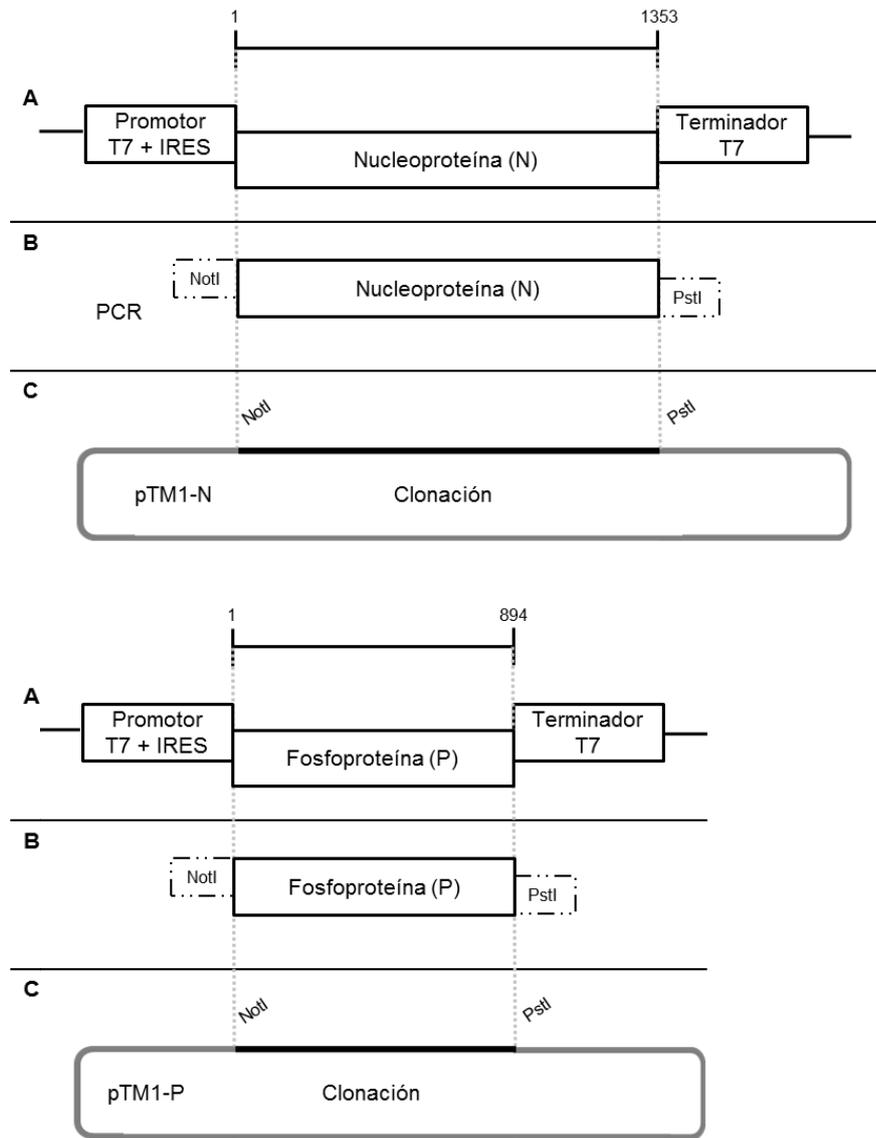


Figura 9. Esquema de ensamblaje del plásmido pTM1-N y pTM1-P.

A) Mapa de la construcción. B) Amplificación de los genes N y P por PCR. C) Ligación de los respectivos genes con el plásmido pTM1.

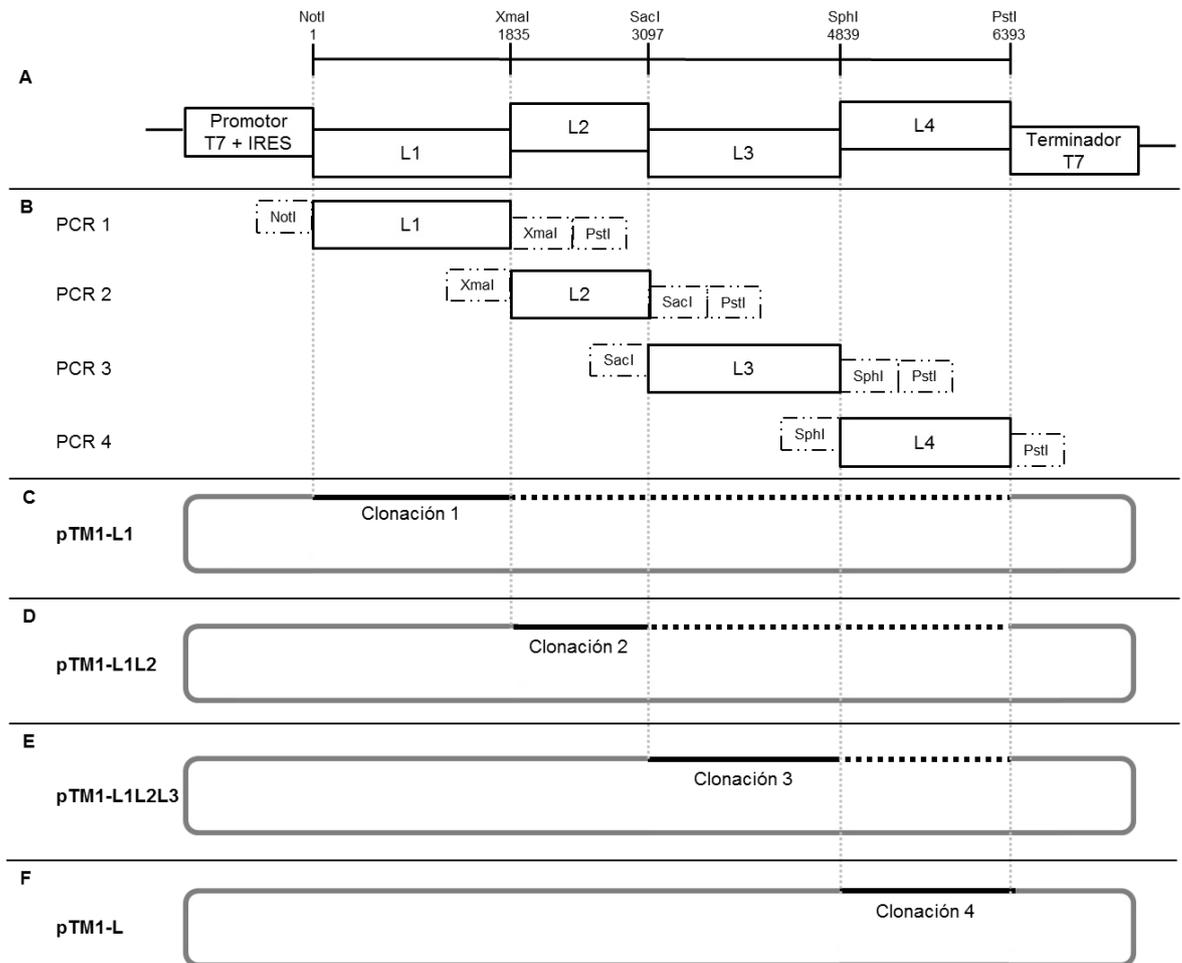


Figura 10. Esquema de ensamblaje del plásmido pTM1-L.

A) Mapa de la construcción. B) Amplificación de los 4 fragmentos que conforman la polimerasa, en los cuadros punteados se muestra las dianas de restricción creadas por PCR. C-F) Ligación de los fragmentos y plásmido respectivos, conforme a la estrategia de clonación.

3.1.2.3 Expresión de enzima T7 en el sistema.

Para comprobar que el plásmido pCAGGs T7 está expresando adecuadamente la polimerasa en las células transfectadas, se construyó un plásmido control que exprese eGFP directamente por la transcripción de la polimerasa T7.

El gen eGFP se lo obtuvo digiriendo con las enzimas EcoRI y BglII del plásmido pCAGGs-eGFP (Fig. 11B). El plásmido pTM1 con el promotor T7 se digirió con las enzimas EcoRI y BamHI (Fig. 11C). A pesar que las enzimas BglII y BamHI reconocen secuencias dianas diferentes, el borde que dejan después de digerir el ADN es compatible y puede ser ligado entre ambas.

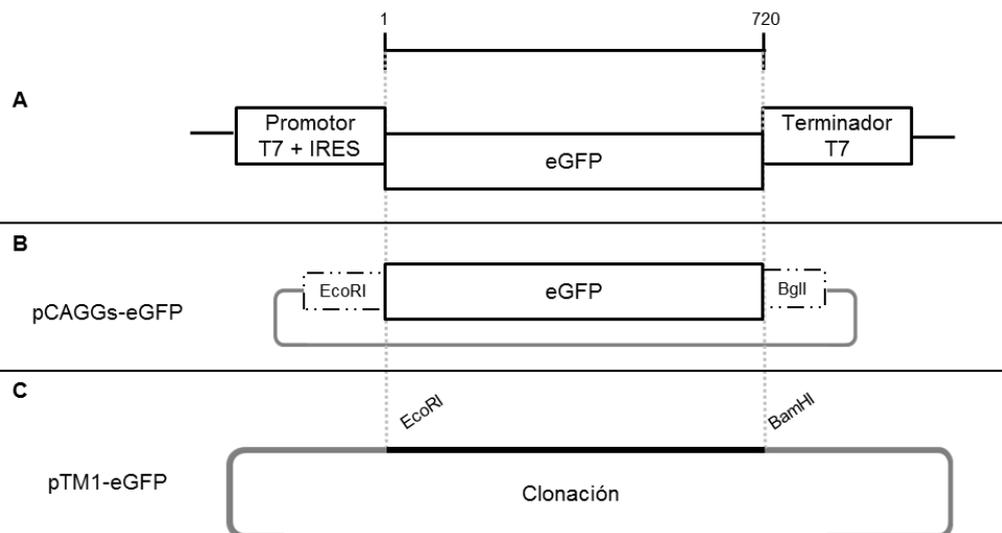


Figura 11. Esquema de ensamblaje del plásmido pTM1-eGFP. A) Mapa de la construcción. B) Digestión de plásmido pCAGGs-eGFP. C) Ensamblaje del plásmido de rescate pTM1-eGFP: Ligación de eGFP con el plásmido pTM1.

Los resultados se observaron 24 horas post-transfección y se presentó fluorescencia en varias de las células transfectadas con ambos plásmidos (Fig.11A). Por el contrario, el plásmido pTM1-eGFP no pudo transcribir el ARN en ausencia del plásmido pCAGGs-T7 (Datos no mostrados).

3.1.3 Rescate minigenoma rábico: relación molar entre plásmidos.

Una vez establecido que el sistema de transcripción de plásmidos funciona (Sección 3.1.2.3 “Expresión de enzima T7 en el sistema”), se experimentó con diferentes concentraciones de los plásmido de rescate (i.e. pTM1-N/P/L y pM1-RVeGFP) para establecer la relación molar más adecuada. Se usaron como punto de inicio las concentraciones determinadas por Martínez-Sobrido, Ghanem, Ito, y Wickersham (24,119,128,149). Los resultados fueron calificados con símbolos “-” y “+,” de acuerdo al rango de células fluorescentes observada: 0(-) ,1-4 (+), 5-8(++), 9-12(+++), <13(++++) (Tabla I.).

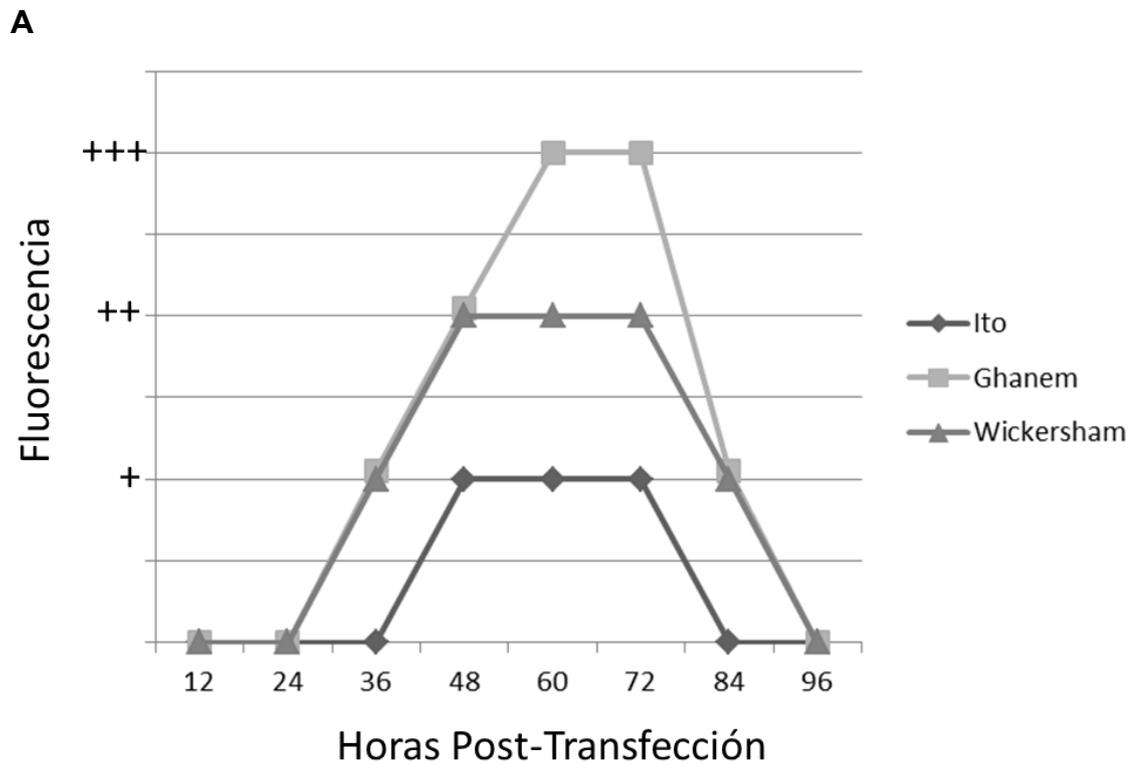
Cada experimento se realizó con su respectivo control negativo el cual consistía en la transfección de todos los plásmidos excepto la polimerasa viral por lo que no se replicaría ni transcribiría el gen reportero en la célula.

Las células fueron monitoreadas cada día después de la transfección y se determinó que la máxima fluorescencia se podía observar al tercer día post-transfección (Fig. 12).

Tabla I. Descripción y concentraciones de los plásmidos transfectados para el rescate del minigenoma.

Interpretación de fluorescencia								
# Células fluorescentes	Nomenclatura							
0	-							
1-4	+							
5-8	++							
9-12	+++							
>13	++++							

Cod.	Referencia	pCAGGs-T7 (μ g)	pM1-RVeGFP(-) (μ g)	pTM1-N (μ g)	pTM1-P (μ g)	pTM1-L (μ g)	Fluores. Promedio	# Replicas
1	Martinez-Sobrido	1	1	1	1	1	-	2
2	Ito	1	2.5	2.5	2.5	0.5	+	3
3	Ghanem	1	4	5	2.5	2.5	+++	3
4	Este estudio	1	4	1	1	1	++	1
5	Wickersham	0.8	2.75	1.4	0.7	0.7	++	3
6	Este estudio	0.8	4.1	1.4	0.7	0.7	++	1
7	Este estudio	0.8	1.4	1.4	0.7	0.7	+	1
8	Este estudio	0.8	2.75	2.1	0.7	0.7	++	1
9	Este estudio	0.8	2.75	0.7	0.7	0.7	++	1



B

	Relación entre plásmidos (μg de ADN)	# de Células Fluorescentes 60 horas Post-Transfección				
		Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio	Puntuación
Ito (2003)	5:5:5:1	2	3	2	2+	
Ghanem (2010)	3:4:2:2	12	14	10	12	+++
Whickersham (2010)	4:2:1:1	7	10	8	8	++

Figura 12. Fluorescencia durante 96 horas post-transfección. A.) Gráfica lineal de la fluorescencia observada durante las 96 horas post-transfección en los 3 experimentos más representativos. B) Ejemplo de la tabla de conteo a 60 horas post-transfección.

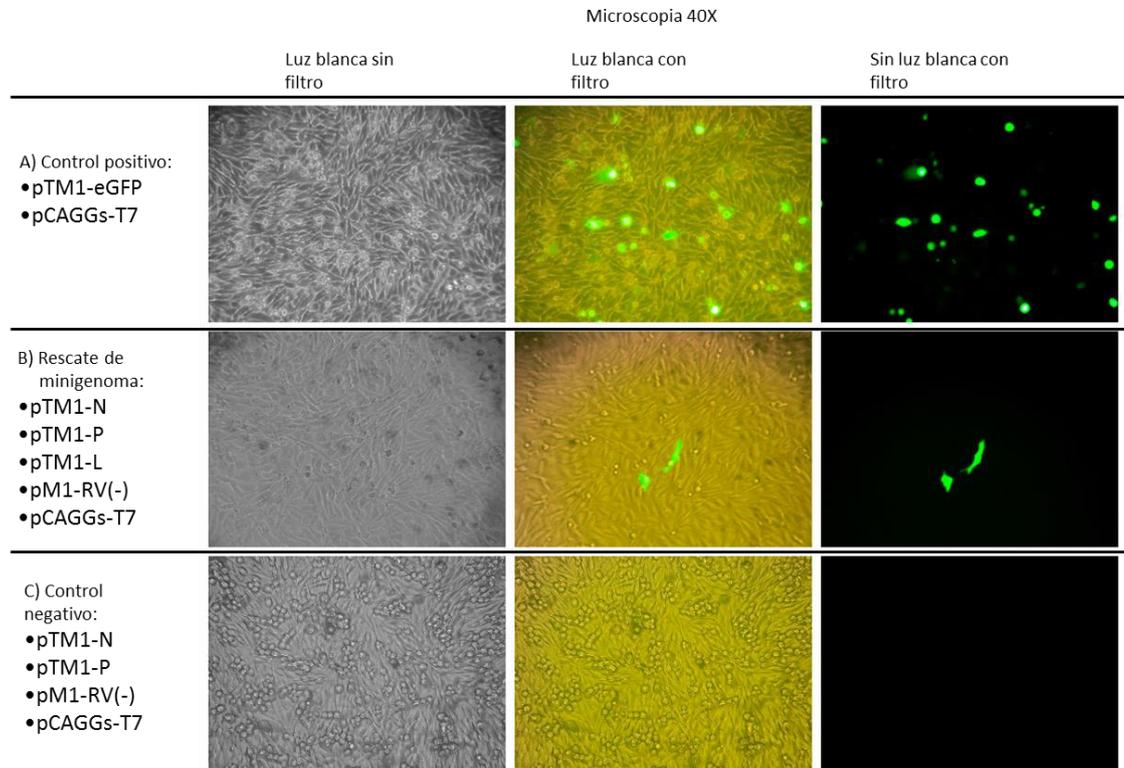


Figura 13. Microscopia de células BHK-21.

A) Control positivo de expresión de la polimerasa T7. B) expresión del gen de fluorescencia del minigenoma por el sistema de replicación viral. C) Control negativo del sistema de replicación viral en ausencia de la

3.1.4 Análisis filogenético de los genes del sistema de rescate.

Con el propósito de determinar la relación filogenética del virus utilizado para el rescate, se analizaron las secuencias obtenidas de los genes N, P y L, junto con otras cepas de rabias reportadas en la base de datos de NCBI.

Los genes N, P y L, así como el gen G, se clonaron en plásmidos de transporte y se secuenciaron. El gen G es de gran interés para futuros estudios inmunológicos con el virus recombinante completo (149).

El análisis se realizó con 39 secuencias de genomas completos de los linajes más representativos de rabia, entre los que se destacan los grupos de virus relacionados a caninos cosmopolita, canino asiático y chiropteras. Las secuencias (Detalladas en la Tabla IV) fueron obtenidas de la base de datos de GenBank NCBI y de ViPR. Para la construcción de los árboles se utilizó el software Mega 5.2(150), con el método de neighbor-joining (151) y el modelo de sustitución Tamura-Nei (152). Se analizó la región completa codificante de proteínas (CDS) que corresponde a 1353, 894, 1575 y 6383 nucleótidos de los genes N, P, G y L respectivamente.

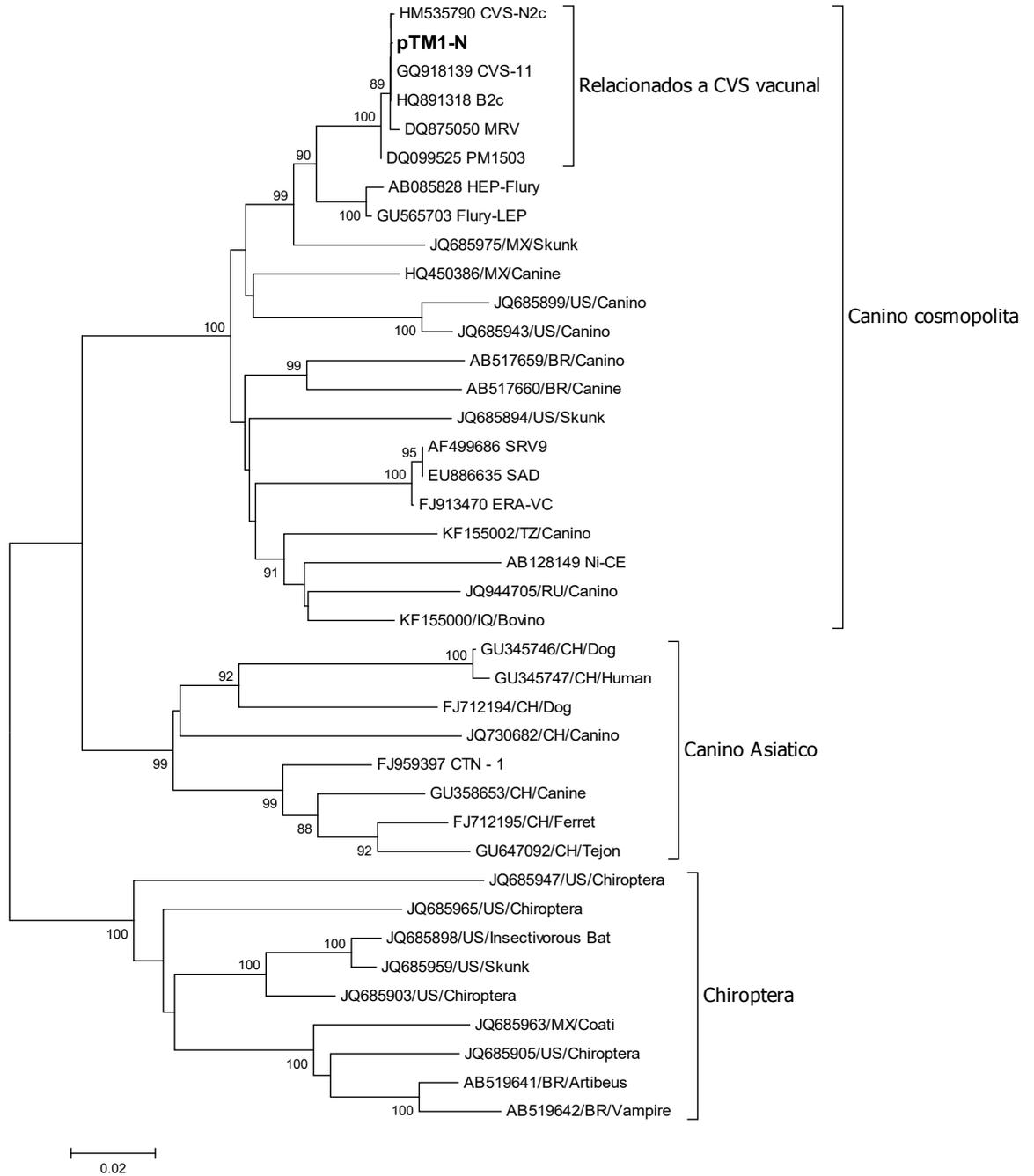


Figura 14. Árbol filogenético del gen N de cepas virales de rabia.

Descripción continúa en la siguiente página.

Figura 14. Árbol filogenético del gen N de cepas virales de rabia.

El análisis se realizó en base a los 1353 nucleótidos de la región codificante del gen N de la cepa vacunal CVS-5, del presente estudio (pTM1-N en negritas), y otras cepas representativas del virus de la Rabia a nivel mundial, obtenidas de la base de datos genética GenBank. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Neighbor-Joining y la distancia genética fue calculada con el modelo Tamura de 3 parámetros. La barra de escala indica las sustituciones de nucleótidos por sitio. El porcentaje de las agrupaciones replicadas en el ensayo de Bootstrap (1000 repeticiones) se muestran junto a cada rama. Los valores de Bootstrap > 80% fueron considerado como un importante apoyo de la topología del árbol. En la descripción de cada secuencia se encuentra: el número de acceso de GenBank, información del país de origen (en código de 2 letras) y la especie en el que fue aislado el virus. Los grupos filogenéticos se indican a la derecha del corchete.

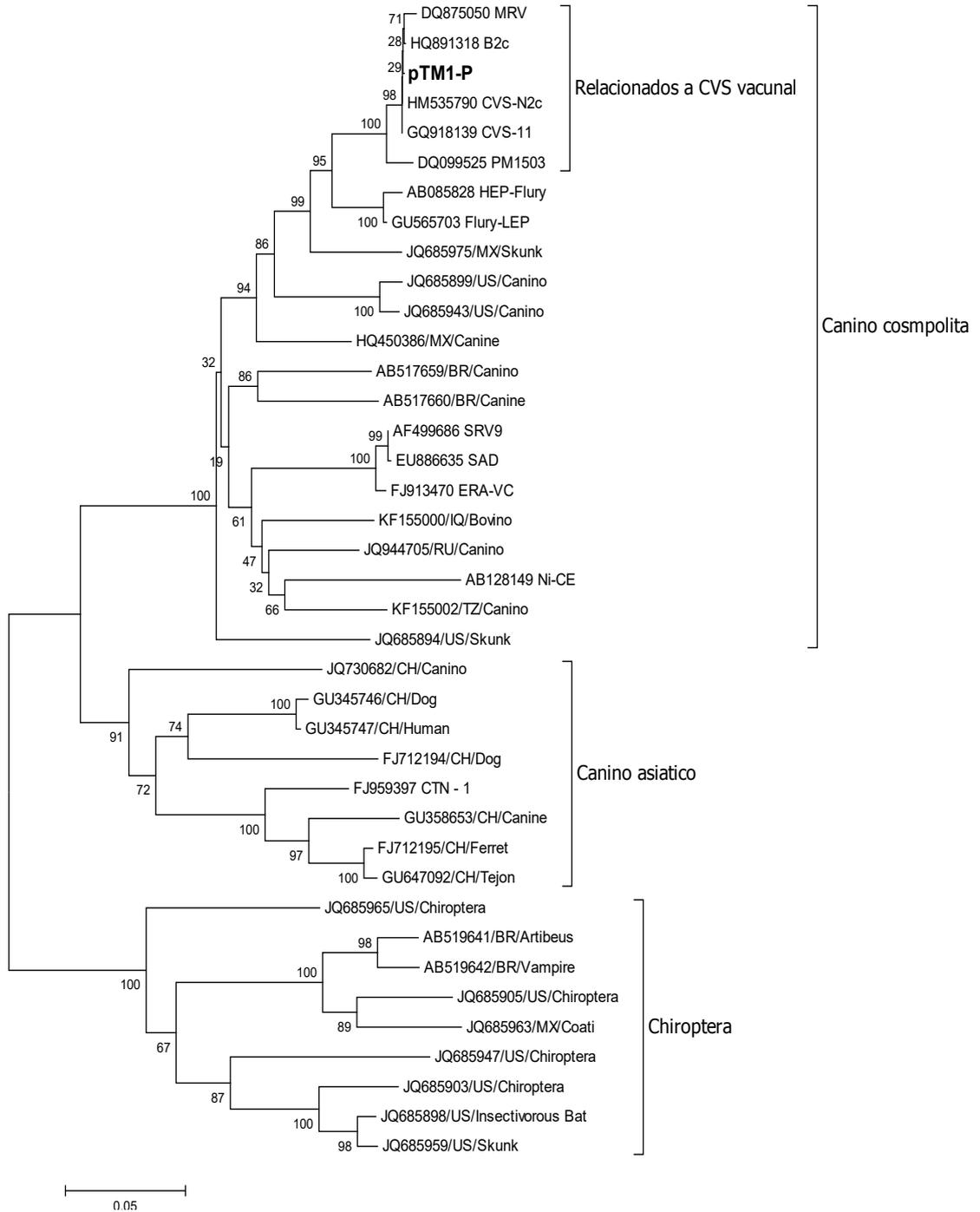


Figura 15. Árbol filogenético del gen P de cepas virales de rabia.

Descripción continúa en la siguiente página.

Figura 15. Árbol filogenético del gen P de cepas virales de rabia.

El análisis se realizó en base a los 894 nucleótidos de la región codificante del gen P de la cepa vacunal CVS-5, del presente estudio (pTM1-P, en negritas), y otras cepas representativas del virus de la Rabia a nivel mundial, obtenidas de la base de datos genética GenBank. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Neighbor-Joining y la distancia genética fue calculada con el modelo Tamura de 3 parámetros. La barra de escala indica las sustituciones de nucleótidos por sitio. El porcentaje de las agrupaciones replicadas en el ensayo de Bootstrap (1000 repeticiones) se muestran junto a cada rama. Los valores de Bootstrap > 80% fueron considerado como un importante apoyo de la topología del árbol. En la descripción de cada secuencia se encuentra: el número de acceso de GenBank, información del país de origen (en código de 2 letras) y la especie en el que fue aislado el virus. Los grupos filogenéticos se indican a la derecha del corchete.

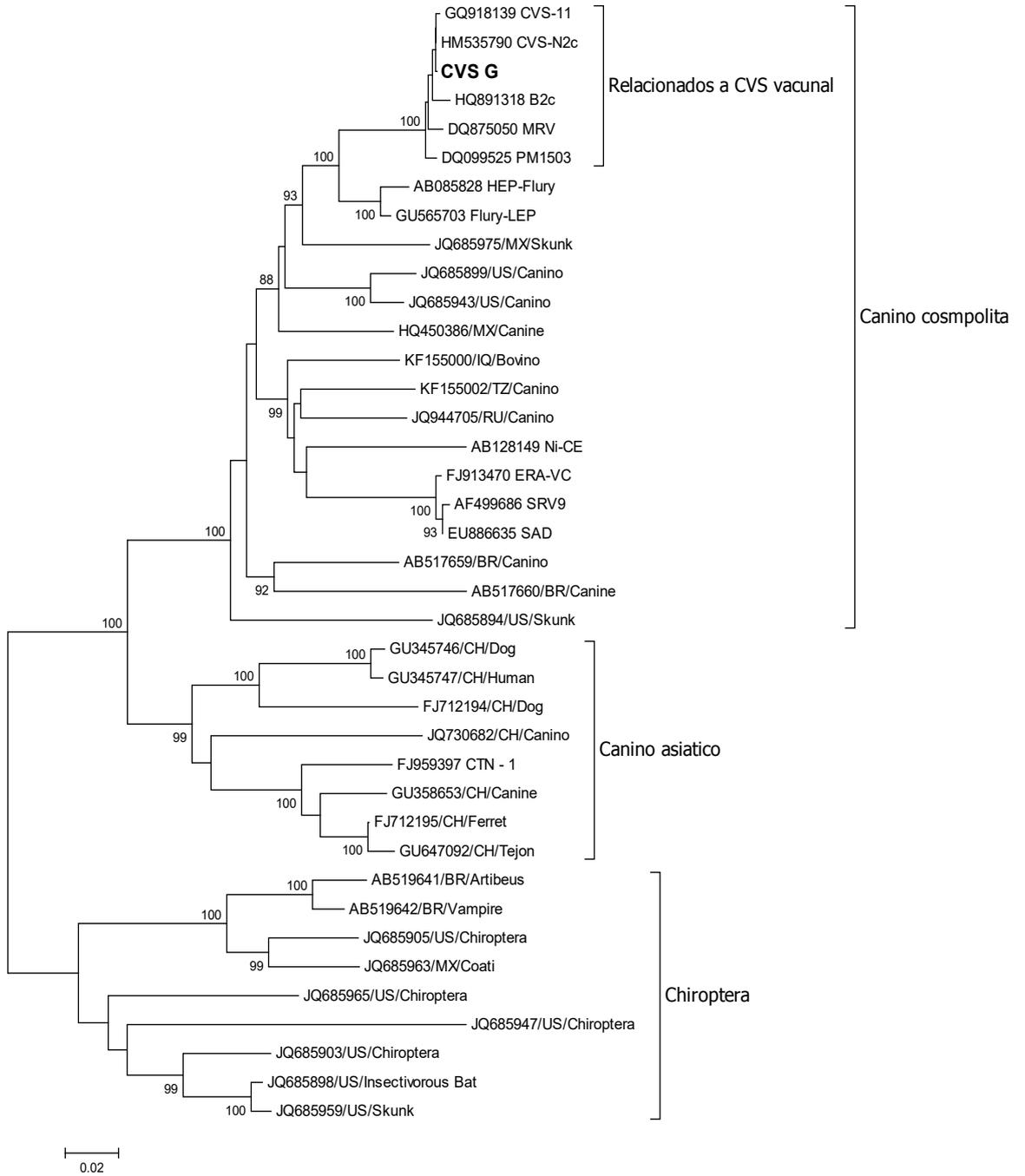


Figura 16. Árbol filogenético del gen G de cepas virales de rabia.

Descripción continúa en la siguiente página.

Figura 16. Árbol filogenético del gen G de cepas virales de rabia.

El análisis se realizó en base a los 1575 nucleótidos de la región codificante del gen G de la cepa vacunal CVS-5, del presente estudio (CVS G, en negrita), y otras cepas representativas del virus de la Rabia a nivel mundial, obtenidas de la base de datos genética GenBank. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Neighbor-Joining y la distancia genética fue calculada con el modelo Tamura de 3 parámetros. La barra de escala indica las sustituciones de nucleótidos por sitio. El porcentaje de las agrupaciones replicadas en el ensayo de Bootstrap (1000 repeticiones) se muestran junto a cada rama. Los valores de Bootstrap > 80% fueron considerado como un importante apoyo de la topología del árbol. En la descripción de cada secuencia se encuentra: el número de acceso de GenBank, información del país de origen (en código de 2 letras) y la especie en el que fue aislado el virus. Los grupos filogenéticos se indican a la derecha del corchete.

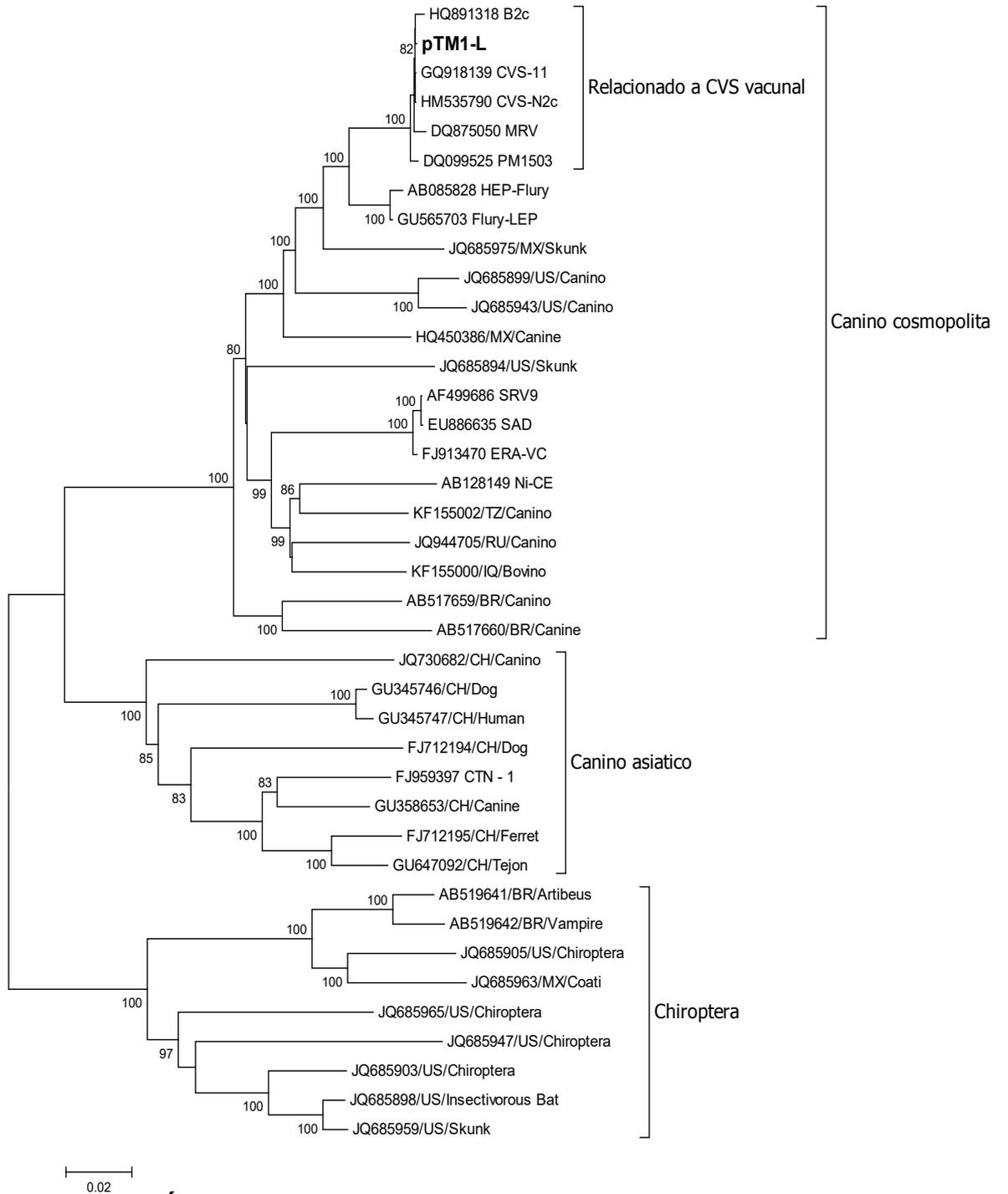


Figura 17. Árbol filogenético del gen L de cepas virales de rabia

Descripción continúa en la siguiente página.

Figura 17. Árbol filogenético del gen L de cepas virales de rabia.

El análisis se realizó en base a los 6383 nucleótidos de la región codificante del gen L de la cepa vacunal CVS-5, del presente estudio (**pTM1-L**, en negrita), y otras cepas representativas del virus de la Rabia a nivel mundial, obtenidas de la base de datos genética GenBank. La historia evolutiva fue inferida usando el método de Neighbor-Joining y la distancia genética fue calculada con el modelo Tamura de 3 parámetros. La barra de escala indica las sustituciones de nucleótidos por sitio. El porcentaje de las agrupaciones replicadas en el ensayo de Bootstrap (1000 repeticiones) se muestran junto a cada rama. Los valores de Bootstrap > 80% fueron considerado como un importante apoyo de la topología del árbol. En la descripción de cada secuencia se encuentra: el número de acceso de GenBank, información del país de origen (en código de 2 letras) y la especie en el que fue aislado el virus. Los grupos filogenéticos se indican a la derecha del corchete.

3.1.5 Discusión

Este estudio genera, por primera vez en Ecuador, un protocolo para el diagnóstico genético de rabia por RT-PCR. Los primers usados para el diagnóstico en esta tesis fueron adaptados de Nadin *et. al.* (146) y funcionaron para todas las muestras probadas. Sin embargo se sugiere realizar estudios posteriores para determinar la sensibilidad de la técnica y compararla con los métodos estándares serológicos y de inoculación en cerebro de ratones lactantes.

Es importante recalcar que la OMS no recomienda sustituir las técnicas tradicionales por los ensayos genéticos en los diagnósticos de rutina (1). Debido a que requieren estrictos controles de calidad y experticia en las técnicas moleculares para evitar falsos positivos por contaminación cruzada. No obstante, los diagnósticos moleculares son una herramienta útil para análisis epidemiológicos y posible aplicación en el diagnóstico ante-mortem (70,78,79).

La cepa (CVS-5) con la que se trabajó en esta tesis fue segregada filogenéticamente dentro del clado relacionado con vacunas humanas como CVS y HEP. Los 4 genes analizados (N, P, G y L) corroboraron la misma

agrupación con un fuerte valor de 100% en el ensayo estadístico de "Bootstrap" (Figs. 14, 15, 16 y 17).

La secuencia genética más cercana a la de este estudio fue CVS11(153). Esto se debe a que el virus CVS-5 utilizado en Ecuador es provisto a partir de este tipo de cepas por el Laboratorio Regional de Referencia de la OPS/OMS.

Al nivel genómico las secuencias tuvieron un porcentaje de similitud de 99.9% para el gen L y 100% para los genes N y P, con respecto a la secuencia de referencia CVS-11. La diferencia de nucleótidos en la polimerasa resultó en el cambio del aminoácido 1588N por 1588D. Aunque, este cambio ha sido reportado en otras secuencias genéticamente cercanas (154–157).

El presente trabajo comprobó que es posible crear *de novo* un minigenoma del virus de la rabia funcional a partir de técnicas de clonación molecular y genética reversa. La fluorescencia en las células transfectadas con el minigenoma prueba que el sistema funciona correctamente, esto se ve validado junto con sus respectivos controles negativos que demuestran que no existe fluorescencia esporádica por otros factores ajenos a la replicación viral (112).

El minigenoma construido en base al plásmido pM1 está insertado de tal manera que se transcribe el gen reportero eGFP en sentido negativo, por lo

que la expresión del mismo solo se podría dar por el correcto funcionamiento del RNP (complejo ARN, N, P y L). Por el contrario, en minigenomas que están clonados en sentido positivo existe la posibilidad que se exprese el gen reportero por traducción directa, sin intervención del mecanismo de replicación viral (158–160).

A pesar que otros estudios muestran cómo influye en el rescate la concentración y relación molar entre los plásmidos transfectados, en nuestra experiencia las concentraciones probadas no produjeron diferencia aparente en cantidad de células fluorescentes (161,162)

CAPITULO 4: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1 Conclusiones

- Se realizó el diagnóstico molecular del virus de la Rabia usando la técnica de RT-PCR, con el objetivo de establecer un protocolo para detectar el virus en futuros análisis de cepas recombinantes.
- Se caracterizó filogenéticamente la cepa CVS-5, usada para producir la vacuna en Ecuador, con la finalidad de determinar su relación y evolución con otras cepas vacunales.
- Se construyó y rescató exitosamente un minigenoma rábico a partir de un sistema derivado sólo de plásmidos en células de mamíferos BHK-21.

4.2 Recomendaciones

- Las técnicas de ADN recombinante aplicadas en esta tesis pueden ser aplicadas para el rescate de otros virus monegavirales.
- A pesar de que las concentraciones de los plásmidos probadas no resultaron en diferencia aparente, se sugiere realizar más ensayos que permitan mejorar la eficiencia del rescate o incorporar secuencias *cis* que incrementen la eficiencia del sistema.

ANEXOS

A. Anexo: Figuras y tablas descriptivas

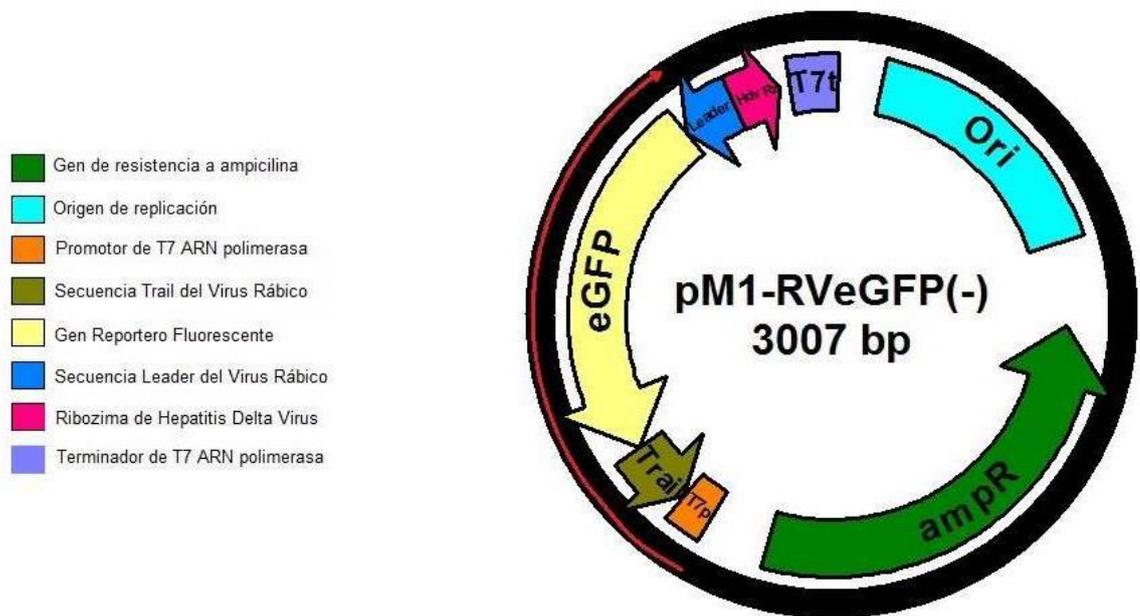


Figura 18. Plásmidos de rescate (Minigenoma)

Esquema de la construcción genética final.

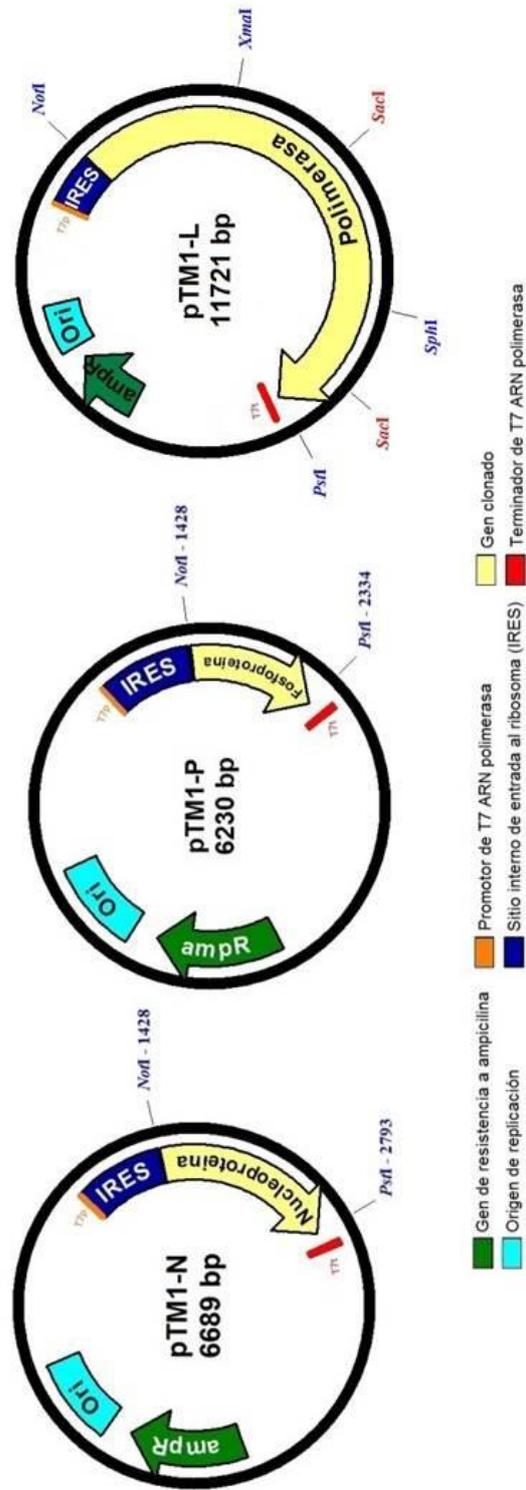


Figura 19. Plásmidos auxiliares.

Esquema de la construcción genética final.

Tabla II. Programa del termociclador para cada amplicón.

Blanco de amplificación	Primer		Tamaño de amplicón	Polimerasa	Programa de termociclaje	
	Forward	Reverse				
ARNv	LdrRV-BsmB-	-	-	Transcriptor	Síntesis de ADNc	55°C x 30min
					Inactivación de RT	85°C x 05min
Diagnóstico set1.	RAB-ESPOL	RABVD1-rev	100	One-Step	Síntesis de ADNc	50°C x 30min
Diagnóstico set2.	RABVD2-for	RABVD2-rev	150	One-Step	Activación de Polimerasa	95°C x 15min
Diagnóstico set3.	RABVD3-for	RABVD3-rev	175	One-Step	x45 Ciclos	Desnat. 94°C x 05seg
Región Leader*	LdrRV-BsmB	LdrRV-SaplR	100	Pfx		Anillación/Extensión 60°C x 60seg
Región Trail*	TrlRV-SpalF	Trl-BsmBIR	150	Pfx	Extensión Final	72°C x 30seg
Gen eGFP	eGFP-CATf	eGFPr	925	Pfx	Activación de Polimerasa	94°C x 05min
CDS del Gen N	NCDSRVf	NCDSRVr	1374	Pfx		
CDS del Gen P	PCDSRVf	PCDSRVr	914	Pfx	x35 Ciclos	Desnat. 94°C x 15seg
CDS del Gen L1	LRV1f	LRV1r	1858	Pfx		Anillación 50°C x 15seg
CDS del Gen L2	LRV2f	LRV2r	1286	Pfx	Extensión	72°C x 02min
CDS del Gen L3	LRV3f	LRV3r	1766	Pfx		Extensión Final 72°C x 05min
CDS del Gen L4	LRV4f	LRV4r	1564	Pfx		
Plásmido PM1	RzFpMI	T7RpMI	2111	Pfx	Activación de Polimerasa	94°C x 05min
Gen G	5IGRGRV	3IGRGRV	2193	Pfx	x35 Ciclos	Desnat. 94°C x 15seg
						Anillación 50°C x 15seg
					Extensión	72°C x 2min30seg
						Extensión Final 72°C x 05min

*Para amplificar las regiones Leader y Traier se utilizó el programa detallado en la tabla sin el paso de "Síntesis de ADNc" y reduciendo el tiempo de "Activación de Polimerasa" a 5 minutos.

Tabla III. Listado de primes del presente estudio.

<i>Nombre</i>	<i>Secuencia</i>	<i>(-mer)</i>
3IGRGRV	CTCARGWTGAGAAGTGTTG	19
5IGRGRV	ATGGTGCCATTAAYCGCTG	20
eGFP-CATf	TTTGCTCTTCTACAATGGTGAGCAAGGGCGAG	32
eGFP _r	TTTGCTCTTCTGGCTTACTTGTACAGCTCGTCC	33
LdrRV-BsmBIF	TTCGTCTCAGGCCACGCTTAACAACAAAACCAG	33
LdrRV-SapIR	TTGCTCTTCTTGTAGGGGTGTTACATT	27
LRV1f	TTATGCGGCCGCCATGCTAGATCCGGGAGAG	31
LRV1 _r	TATTCTGCAGGTGACCCGGGAATAGTCC	28
LRV2f	TATTCCCGGGTCACATACG	19
LRV2 _r	TATTCTGCAGTGAAGAGCTCACTGAGAAATC	31
LRV3f	CAGTGAGCTCTTCAGTTCGTC	21
LRV3 _r	TATTCTGCAGAGCTGCATGCCGCACCTC	28
LRV4f	TGCGGCATGCAGCTAGAAC	19
LRV4 _r	TTATCTGCAGTTACAAACAACACTGTAATCTAG	31
LRV1323 _r	TGTTTGGGTGGCCATGTTTG	20
LRV1543f	CACCTGTCAATCCCCGAG	18
LRV3202 _r	GGATCTCTGAGTTGTAGAAGG	21
LRV3714f	GCCTTGCATAGGTTCAAGTC	20
LRV5013 _r	ACTGAACCACTCTCAGGCC	19
NCDSRVf	TTAGCGGCCGCCATGGATGCCGACAAGATTG	31
NCDSRV _r	TGTCTGCAGTTATGAGTCATTGAATACG	29

PCDSRVf	TTAGCGGCCGCCATGAGCAAGATCTTTGTTAATC	34
PCDSRVr	TTCTGCAGTTAGCAGGATGTATAGCGATTC	30
RAB-ESPOLF	ATGGATKCYGACARGATTGT	20
RABVD1-rev	GCMGGRTAYTTRTAYTCATA	20
RABVD2-for	TRATGACAACYCACAARATGT	21
RABVD2-rev	TGARCAGTCYTCRTARGC	18
RABVD3-for	AYTTCTTCCAYAARAACCTTYGA	22
RABVD3-rev	CATCCRACAAAGTGRATGAG	20
RzFpMI	ATAGCATGCTCGTCTCAGGCCGGCATGGTCCCAGC	35
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	18
T7	TAATACGACTCACTATAG	18
T7RpMI	TATGCATGCCGTCTCACCCCTATAGTGAGTCGTATTAG	37
TrI-BsmBIR	TTCGTCTCTAGGGACGCTTAACAAAAAACAATAAAG	37
TrIRV-SpaIF	TTGCTCTTCTGCCGGATATTACCGAAAG	28

Tabla IV. Listado de secuencias utilizadas en el análisis filogenético.

Código de Acceso	Autor principal	Referencia	Organismo hospedero/Cepa vacunal	País de Origen
AB085828	Inoue,K.	(123)	HEP-Flury	-
AB128149	Shimizu,K.	(163)	Ni-CE	-
AB517659	Mochizuki,N.	-	Canino	Brasil
AB517660	Mochizuki,N.	-	Canino	Brasil
AB519641	Mochizuki,N.	-	Murciélagos	Brasil
AB517659	Mochizuki,N.	-	Canino	Brasil
AF499686	Yuan,H.	-	SRV9	-
DQ099525	Stallkamp,I	-	PM1503	-
DQ875050	Zhao,Y.J.	-	MRV	-
EU886635	Muller,T	(13)	SAD	-
FJ712194	Wang,X.G.	(164)	Canino	China
FJ712195	Wang,X.G.	(164)	Hurón	China
FJ913470	Guo,L.	(165)	ERA-VC	-
FJ959397	Yu,Y.X.	(166)	CTN-1	-
GQ918139	Wang,L.	(153)	CVS-11	-
GU345746	He,C.Q.	(167)	Canino	China
GU345747	He,C.Q.	(167)	Humano	China
GU358653	He,C.Q.	(167)	Canino	China
GU565703	Tao,L.	(168)	Flury-LEP	-
GU647092	Zhang,S.	-	Tejón	China

HM535790	Wirblich,C.	(154)	CVS-N2c	-
HQ450386	Zhang,G	(169)	Canino	-
HQ891318	Zhang,G	(156)	B2c	-
JQ685894	Kuzmin,I.V	(170)	Mofeta	USA
JQ685898	Kuzmin,I.V	(170)	Murciélagos	USA
JQ685899	Kuzmin,I.V	(170)	Canino	USA
JQ685903	Kuzmin,I.V	(170)	Murciélagos	USA
JQ685905	Kuzmin,I.V	(170)	Murciélagos	USA
JQ685943	Kuzmin,I.V	(170)	Canino	USA
JQ685947	Kuzmin,I.V	(170)	Murciélagos	USA
JQ685959	Kuzmin,I.V	(170)	Mofeta	USA
JQ685963	Kuzmin,I.V	(170)	Coati	México
JQ685965	Kuzmin,I.V	(170)	Murciélagos	USA
JQ685975	Kuzmin,I.V	(170)	Mofeta	México
JQ730682	Zhang,J.	(171)	Canino	China
JQ944705	Chupin,S.	-	Canino	Rusia
KF155000	Marston,D.A.	(172)	Bovino	Iraq
KF155002	Marston,D.A.	(172)	Canino	Tanzania

B. Anexo: Protocolos.

1. Extracción de ARN.
2. Síntesis de ADNc
3. Amplificación por PCR
4. Electroforesis y purificación de amplicones
5. Digestión de amplicones y plásmido
6. Ligación
7. Transformación en bacterias DH5alfa
8. Selección de colonias
9. Extracción de ADN plasmídico
10. Preparación de muestras para Secuenciación
11. Descongelación y siembra de células
12. Cosecha y resiembra de células.
13. Transfección en células BHK-21

1) *Extracción de ARN*

Notas

Este protocolo está definido para muestras predominantemente líquidas

Equipos y Materiales

- Microtubos de 1.5ml
- Vortex
- Microcentrífuga
- Cabina de Flujo Laminar

Insumos

- TRI REAGENT LS (MRC) o
- Acetato de Sodio
- TRIZOL LS (INVITROGEN)
- Isopropanol
- Glycogen (AMBION)
- Etanol

Proceso

1. A un microtubo de ≈ 1.5 ml conteniendo 250 μ l de muestra, agregar 750 μ l de TRI REAGENT LS
 - Homogenizar la muestra pipeteando 2 veces, sin hacer burbujas
 - La relación entre volumen de trizol y la muestra es 3:1
2. Dejar reposar a T.A. por 5 min. (Aquí se puede parar y guardar la muestra hasta un mes a -60°C o -70°C)

3. Agregar 200ul de cloroformo, rápidamente mezclar en el vortex.
4. Dejar a T.A. por 10 min.
5. Centrifugar a 14,000g por 15 min a 4 °C (Se debe observar 2 fases).
6. Retirar la fase acuosa (sobrenadante aprox. 500ul) y transferir a un tubo nuevo de ≈1.5ml que contenga 4 µl de glucógeno (AMBION, 5mg/ml) y 50 µl de acetato de sodio 3M (pH5.2). (Tratar de no tomar la interface). Vortex.
7. Agregar 500ul de isopropanol. Vortex.
8. Dejar a T.A. por 10 min y centrifugar a 14,000g por 10 min.
9. Retirar el sobrenadante tratando de no tocar el pellet (Se puede dejar ≈ 50ul).
10. Agregar 1000ul de etanol 75% (Preferiblemente helado). Vortex.
11. Centrifugar a 14,000g por 5 min a 4 °C.
12. Retirar el sobrenadante tratando de no tocar el pellet.
13. Agregar 1000ul de etanol 75%. Vortex (Aquí se puede parar y dejar a 4°C hasta el día siguiente o -20°C hasta un año).
14. Centrifugar a 14,000g por 5 min a 4 °C.
15. Retirar todo el sobrenadante lo más posible sin llevarse el pellet de ARN.
16. Secar el pellet con tubo abierto en la cabina de flujo laminar, 5-10min.
17. Resuspender el ARN en ≈ 25ul de agua ultra pura.

2) *Síntesis de ADNc*

Equipos y Materiales

- Microtubos de 1.5ml
- Tubos de PCR 0.2ml
- Cabina de Flujo Laminar o Cabina de PCR
- Termociclador

Insumos

- Kit Transcriptor (ROCHE)

Proceso

1. Preparar la mezcla maestra según el fabricante.
 - En el caso de este estudio se utilizó el kit Transcriptor (ROCHE) con las concentraciones detalladas en la tabla V.

Tabla V. Condiciones de Reacción para síntesis de ADNc

<i>Concentración inicial</i>	<i>Componentes</i>	<i>Volumen por Reacción(μl)</i>	<i>Concentración final</i>
5X	Buffer	4	1X
40U/μl	RNAse inhibitor	0.5	20U
10mM	dNTPs	2	1mM
20μM	Primer específico	2	2μM
20U/μl	Transcriptasa Reversa	0.5	10U
	ARN	8	
	Agua ultra pura	3	
	VOLUMEN FINAL	20	

2. Preparar por cada reacción un control RT(-) el cual contiene todos los componentes excepto la enzima transcriptasa reversa.
 - Este control no debe amplificar para poder asegurar una reacción libre de contaminación por ADN.
3. Correr las muestras en el termociclador tal como se detalla en la Tabla III.

3) *Amplificación por PCR*

Equipos y Materiales

- Microtubos de 1.5ml
- Tubos de PCR 0.2ml
- Cabina de Flujo Laminar o Cabina de PCR
- Termociclador

Insumos

- Kit de amplificación
Platinum PFX
(INVITROGEN)

Proceso

1. Preparar la mezcla maestra según el fabricante.
 - En este estudio se utilizó el kit Platinum PFX (INVITROGEN) con las concentraciones detalladas en la tabla VI

Tabla VI Condiciones de Reacción para PCR con enzima de alta fidelidad.

<i>Concentración inicial</i>	<i>Componentes</i>	<i>Volumen por Reacción(μl)</i>	<i>Concentración final</i>
10X	Buffer	5	1X
10mM	dNTPs	1.5	0.3mM
50mM	Mg ₂ SO ₄	1	1mM
10μM	Mezcla de Primer (Forward y Reverse)	1.5	0.3μM
2.5U/μl	Platinum Pfx	0.4	1U
	ADNc	1	
	Agua ultra pura	39.6	
	VOLUMEN FINAL	50	

2. Correr las muestras en el termociclador tal como se detalla en la Tabla III según la región genética que se desee amplificar.

4) *Electroforesis y purificación de amplicón*

Equipos y Materiales

- Cámara de electroforesis
Horizontal

Insumos

- Agarosa Ultrapura
- Sybr Safe (INVITROGEN)
- 10X Loading Buffer (50% Glycerol, 10mM Tris-HCL, 0.25% Bromophenol Blue)

Proceso

1. Preparar de gel de agarosa al 1%: 0.5g de Agarosa en 50ml buffer TBS 0.5X (45 mM Tris-base, 44 mM ácido bórico, 10mM EDTA; pH 8).
2. Calentar la solución hasta disolverse por completo y agregar 5µl de tinte en gel de ADN (10000X SYBR® Safe)
3. Agregar los peines/pocillos y dejar el gel reposar en el contenedor por 20 minutos a temperatura ambiente.
4. Sumergir por completo el gel en 0.5X TBE dentro de la cámara de electroforesis.

5. Cargar cada producto de PCR con 2X (Concentración final) de loading buffer en los pocillos.
6. Correr electroforesis a 200V por 20 minutos (o lo permitido por la distancia recorrida).
7. Revelar ADN en cámara de UV.
8. Seleccionar los amplicones adecuados.
9. Purificar según el protocolo del kit High Pure PCR Product Purification (ROCHE) disponible en internet:
https://cssportal.roche.com/LFR_PublicDocs/ras/11732668001_en_15.pdf.

5) Digestión

Equipos y Materiales

- Baño maría o incubadora
37°C
- Cámara de electroforesis
Horizontal

Insumos

- Enzima de Digestión
(endonucleasas)
- Gel de Agarosa
- Sybr Safe (INVITROGEN)
- 10X Loading Buffer (62.5%
Glycerol, 0.625%SDS,
0.25% Bromophenol Blue)

Proceso

1. Digerir el ADN con la endonucleasas acorde a la estrategia de clonación planteada. Las condiciones generales para una doble digestión se detallan en la tabla VII.

Tabla VII Condiciones de Reacción para digestión de ADN

<i>Concentración inicial</i>	<i>Componentes</i>	<i>Volumen por Reacción(μl)</i>	<i>Concentración final</i>
10X	Buffer	5	1X
10X ¹	BSA	5	0.3mM
10-20U/μl ²	Enzima 1	0.25-0.5	2.5-5U
10-20U/μl ²	Enzima 2	0.25-0.5	2.5-5U
	Agua ultra pura	39-39.5	
	VOLUMEN FINAL	50	

¹El BSA no es necesario para todas las endonucleasas pero su presencia en la reacción no afecta la eficiencia de los cortes.

²La mayoría de las enzimas oscila su concentración entre 10-20U/μl. Las enzimas con menor concentración, como SapI (2U/μl) requieren mayor volumen en la reacción.

2. Incubar la reacción a 37°C por 1 hora
 - Algunas enzimas requieren temperaturas diferentes para llegar a su actividad enzimática óptima. Como es el caso de BsmBI (55°C).
3. Cargar las muestras en un gel de agarosa al 1% y correr la electroforesis.
4. Seleccionar las bandas para el plásmido y el amplicón digerido (Inserto)
5. Purificar las bandas en el gel de agarosa por medio del kit High Pure PCR Product Purification (ROCHE).

6) *Ligación*

Insumos

- Enzima Ligasa

Proceso

1. Ligar el plásmido e inserto digeridos con bordes compatibles usando la enzima t4 ligasa (NEB) en una reacción de 10ul que contiene: 1ul de 10X Buffer y 0.5ul de ligasa (200 unidades cohesivas).
 - Los 8.5ul restante se utilizan para repartir el volumen entre el plásmido y el inserto manteniendo la relación molar de 1:8.
2. Incubar la reacción a 4°C por toda la noche (aprox 12 horas).

7) *Transformación*

Equipos y Materiales

- Baño maría
- Refrigerador de -80°C
- Incubadora 37°C

Insumos

- Bacterias DH5α químicamente competentes (INVITROGEN)
- 0.1M IPTG
- 50ug/ul XGAL
- Medio de cultivo líquido LB
- Placas de cultivo LB agar
- Ampicilina 50ug/ul

Proceso

1. Enfriar los tubo de polipropileno de 17cm para cultivo (Uno por cada transformación que se realice) en una cubeta con hielo.

2. Descongelar las bacterias DH5 α (Almacenadas a -80°C) colocándolas en la cubeta de hielo.
3. Distribuir 50ul de bacterias a cada tubo de polipropileno frio.
4. Adicionar al tubo unos 5ul del producto de ligación
5. Incubar las bacterias con el producto de ligación en hielo por 30 min, sin movimiento.
 - Desde el paso 1 hasta el 5 mantener siempre la cadena de frio para las bacterias
6. Luego ponga el tubo en baño maría a 42°C por 42 seg
7. Regrese el tubo a la cubeta de hielo por 2 min
8. Adicione unos 950 μ l de LB estéril al tubo
9. Incubar con rotación (225rpm) a 37°C por 1 hora.
10. Durante este periodo de incubación esparcir 20ul de XGal y 100ul de IPTG sobre la superficie de las placas LB-agar con ampicilina (50ug/ml) y dejar secar a 37°C por lo menos por 20 minutos.
11. Posterior a la incubación de una hora a 37°C, centrifugar las bacterias a 6800g por 3 minutos y resuspender en 100ul de LB.
12. Sembrar los 100ul de bacteria en las placas preparadas.
13. Incubar las placas a 37°C por 24 horas.

8) *Selección de colonias*

Nota

La selección de las colonias con los plásmidos adecuados puede variar dependiendo del plásmido y los genes que presente, en esta tesis se seleccionaron las colonias por un “screening” del inserto adecuado haciendo una PCR directamente a cada una.

Equipos y Materiales

- Microtubos de 1.5ml
- Tubos de PCR 0.2ml
- Cabina de Flujo Laminar o
Cabina de PCR
- Termociclador
- Cámara de electroforesis
Horizontal

Insumos

- Platinum TAQ Polymerase
(INVITROGEN)
- Agarosa Ultrapura
- Sybr Safe (INVITROGEN)

- 10X Loading Buffer (62.5% Glycerol, 0.625% SDS, 0.25% Bromophenol Blue)

Proceso

1. Preparar la mezcla maestra según el fabricante utilizando el kit Platinum TAQ con las concentraciones detalladas en la tabla VIII.

Tabla VIII Condiciones de Reacción para PCR (Screening)

<i>Concentración inicial</i>	<i>Componentes</i>	<i>Volumen por Reacción(μl)</i>	<i>Concentración final</i>
10X	Buffer	2	1X
10mM	dNTPs	0.4	0.2mM
50mM	MgCL ₂	0.6	1.5mM
10μM	Mezcla de Primer ¹ (Forward y Reverse)	1	0.5μM
2.5U/μl	Platinum TAQ	0.08	1U
	Colonia	-	
	Agua ultra pura	14.92	
	VOLUMEN FINAL	19	

¹Los primers utilizados para la selección de las colonias dependerán del inserto que se desee detectar, usualmente se usa el mismo set de primers con los que se amplificó el inserto y las mismas condiciones de PCR.

2. Picar cada colonia con una punta de micropipeta de 200ul y diluir en el tubo que contiene la reacción de PCR.
3. Correr el termociclador acorde a las condiciones de PCR establecidas para el inserto que se desee amplificar (Ver Tabla I.)
4. Cargar las muestras en un gel de agarosa al 1% y correr la electroforesis.

9) Extracción de ADN plasmídico

Equipos y Materiales

Microtubos de 1.5ml

Insumos

Kit High Pure Plasmid Isolation Kit (ROCHE)

Proceso

1. Las colonias seleccionadas por PCR con el inserto adecuado se vuelven a picar de la placa y se extrae el ADN plasmídico siguiendo el protocolo del kit High Pure Plasmid Isolation (ROCHE) disponible en internet: <https://lifescience.roche.com>.

10) Preparación de muestras para secuenciación

Equipos y Materiales

- Microtubos de 1.5ml

- Nanodrop 2000.

Proceso

1. Medir la pureza y concentración de ADN plasmídico de cada muestra con la ayuda del equipo Nanodrop2000.

2. Preparar alícuotas de cada plásmido a una concentración de 50ng/μl
 - 10 μl de cada alícuota fue enviada a la compañía Genewiz para secuenciar junto con 5ul de su respectivo primer de secuenciación a 5uM.

11) Descongelación y siembra de células.

Equipos y Materiales

- Incubadora de CO₂
- Centrifuga refrigerada
- Bomba de vacío
- Micropipetas (Según el volumen a trabajar)
- Pipetas Serológica 10ml
- Cabina de Bioseguridad Biológica (CBB)

Insumos

- Buffer fosfato salino (PBS)
- Medio de cultivo DMEM + 10%
- Lipofectamina 2000 (INVITROGEN)
- Frasco de cultivo celular 75cm² (Flask)
- Frasco de cultivo celular 25cm² (Flask)
- Pipetas Pasteur
- Células BHK-21

Proceso

1. Si los crioviales están en nitrógeno líquido, previamente colocarlos a -80°C (24h antes).
2. Limpiar y desinfectar con alcohol 70% la CBB
3. Rociar con alcohol 70% todos los materiales y recipientes que se van a usar, antes de ingresarlos a la CBB.
4. Tener listo un tubo estéril de 15ml con 10ml de medio de cultivo (DMEM+10%FBS)
5. Descongelar las células rápidamente en Baño María a 37°C .
6. Rociar el criovial con alcohol 70% e inmediatamente con una micropipeta tomar el contenido (aprox. 1.5ml) y re suspenderlo en los 10ml de medio (DMEM+10%FBS). Esto es para evitar el efecto tóxico del DMSO.
7. Centrifugar a 500g por 5 min a 15°C .
8. Eliminar el sobrenadante y re suspender con mucho cuidado el pellet en 1ml de medio de cultivo (DMEM+10%FBS).
9. Sembrar en un flask de 25cm² que contenga 5ml de medio (DMEM+10%FBS).
10. Colocar horizontalmente el flask y mover suavemente hacia arriba y hacia abajo, sobre una superficie plana, para distribuir las células y crezcan de manera homogénea.

11. Colocar las células a 37°C y con 5% de CO₂, previamente verificar que la incubadora posee agua para mantener la humedad.
12. Después de 24 horas observar si las células no presentan contaminación, si la densidad es alrededor del 70%, hacer lavados con PBS 1x para retirar las células muertas y cambiar de medio.

12) *Cosecha y Resiembra de células en Flask 75cm².*

Equipos y Materiales

- Incubadora de CO₂
- Centrifuga refrigerada
- Bomba de vacío
- Micropipetas (Según el volumen a trabajar)
- Pipetas Serológica 10ml
- Cabina de Bioseguridad Biológica (CBB)

Insumos

- Buffer fosfato salino (PBS)
- Medio de cultivo (DMEM + 10%)
- Frasco de cultivo celular 75cm² (Flask)
- Pipetas Pasteur
- Células BHK-21

Proceso

1. Lavarse las manos con jabón y alcohol 70%
2. Rociar con alcohol 70% todos los instrumentos que se van a usar (pipetas, frascos con medio, flasks, etc.)

3. Colocar el flask el lado contrario de donde se encuentran las células, inclinar un poco y retirar el medio de cultivo sin tocar los bordes. (Para evitar contaminación).
4. Lavar las células con 5 ml de PBS 1X del lado contrario de las células (para evitar desprendimiento). Invertir el flask y mover un poco para que el PBS retire todos los desechos. Hacerlo 2 veces en el caso de MDCKs.
5. Retirar el PBS 1X y agregar 2 ml de 0.25% Trypsin-EDTA
6. Mover el flask para que la tripsina entre en contacto con toda la superficie y dejar incubar a 37°C y 5% CO₂ por aprox. 5 min.
7. Tener listo un nuevo flask de 75cm² con 12-14ml de medio de cultivo (1X D-MEM+10%FBS).
8. Retirar de la incubadora y dar topes suaves al flask para ayudar a desprender las células restantes
9. Agregar 10ml de medio de cultivo (1X D-MEM+10%FBS) para inhibir el efecto de la tripsina y homogenizar suavemente hasta eliminar acumulaciones de células.
10. Tomar 1-3 ml del medio con células, dependiendo de la densidad y tiempo en que se quiera obtener el 100% y agregar en el nuevo flask.
11. Rotular el flask con nombre de la línea celular, #de pase, fecha y persona que realizo el pase.

12. Colocar el flask de manera horizontal y homogenizar el medio moviendo hacia arriba y hacia abajo.
13. Incubar a 37°C y con 5% de CO₂, hasta obtener el 100% de densidad para hacer el siguiente pase

13) Transfección en células BHK-21

Nota

El protocolo de Martínez-Sobrido (2010) fue adaptado a las condiciones técnicas del laboratorio donde fue desarrollada la presente investigación (24).

Equipos y Materiales

- Incubadora de CO₂
- Centrifuga refrigerada
- Bomba de vacío
- Micropipetas (Según el volumen a trabajar)
- Pipetas Serológica 10ml
- Cabina de Bioseguridad Biológica (CBB)

Insumos

- OptiMEM (INVITROGEN)
- Buffer fosfato salino (PBS)
- Medio de cultivo DMEM + 10%
- Lipofectamina 2000 (INVITROGEN)
- Frasco de cultivo celular 75cm² (Flask)
- Placas de cultivo de 6 pocillos
- Pipetas Pasteur
- Células BHK-21

Proceso

1. Preparar una solución con 250ul de OptiMEM y 6ul de Lipofectamina (LPF200) por cada transfección.
2. Incubar 10 minutos a temperatura ambiente (Continuar con el siguiente paso durante este lapso).
3. Preparar la mezcla de plásmidos que serán transfectados en 50ul de OptiMEM.
4. Juntar las soluciones del paso 1 con el paso 3 e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos ambiente (Continuar con el siguiente paso durante este lapso).
5. Cosechar células de un flask de 75cm² con 80-90% de confluencia:
 - a. Limpiar y desinfectar con alcohol 70% la CBB
 - b. Rociar con alcohol 70% todos los materiales y recipientes que se van a usar, antes de ingresarlos a la CBB.
 - c. Tener listo un tubo estéril de 15ml con 10ml de medio de cultivo (DMEM+10%FBS)
 - d. Colocar el flask del lado contrario de donde se encuentran las células, inclinar un poco y retirar el medio de cultivo sin tocar los bordes. (Para evitar contaminación).

- e. Lavar las células con 5 ml de PBS 1X del lado contrario de las células (para evitar desprendimiento). Invertir el flask y mover un poco para que el PBS retire todos los desechos. Hacerlo 2 veces en el caso de MDCKs.
 - f. Retirar el PBS 1X y agregar 2 ml de 0.25% Trypsin-EDTA
 - g. Mover el flask para que la tripsina entre en contacto con toda la superficie y dejar incubar a 37°C y 5% CO₂ por aprox. 5 min.
 - h. Resuspender células con 10ml de medio y centrifugar a 500g por 5 minutos a 15°C.
 - i. Retirar todo el sobrenadante y resuspender el pellet en 3-4ml de medio.
 - j. Añadir 250ul a cada pocillo de la placa de cultivo.
6. Luego de los 30 minutos de incubación añadir 1ml de medio al Paso 4.
 7. Agregar la solución del paso 6 a cada uno de los pocillos con las células a ser transfectadas.
 8. Gentilmente agitar la placa y dejar la transfección incubar toda la noche a 37°C con 5%CO₂
 9. Al día siguiente retirar el medio de transfección (Paso 7) y remplazarlo con medio de cultivo (DMEM + 10%FBS*).

Nota: El protocolo original usa 0.3% de BSA, en el laboratorio fue sustituido por 10%FBS por asuntos técnicos.

10. Incubar a 37°C con 5%CO₂ el tiempo requerido para ver fluorescencia.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO Expert Consultation on Rabies WHO. WHO expert consultation on rabies: second report. 2013.
2. Organización Panamericana de la Salud (OPS). Conclusiones de la REDIPRA 13: Oportunidades para invertir en la Eliminación de la Rabia Humana en las Américas. 2010.
3. Ministerio de Salud Pública del Ecuador, Organización Panamericana de la Salud. Evaluación del Programa Nacional de Control de la Rabia del Ecuador. Informe Final; 2003.
4. Streicker DG, Recuenco S, Valderrama W, Gomez Benavides J, Vargas I, Pacheco V, et al. Ecological and anthropogenic drivers of rabies exposure in vampire bats: implications for transmission and control. Proc Biol Sci. 7 de septiembre de 2012;279(1742):3384-92.
5. Schneider MC, Romijn PC, Uieda W, Tamayo H, da Silva DF, Belotto A, et al. Rabies transmitted by vampire bats to humans: an emerging zoonotic disease in Latin America? Rev Panam Salud Pública Pan Am J Public Health. marzo de 2009;25(3):260-9.

6. Kobayashi Y, Sato G, Mochizuki N, Hirano S, Itou T, Carvalho AA, et al. Molecular and geographic analyses of vampire bat-transmitted cattle rabies in central Brazil. *BMC Vet Res*. 5 de noviembre de 2008;4:44.
7. Velasco-Villa A, Orciari LA, Juárez-Islas V, Gómez-Sierra M, Padilla-Medina I, Flisser A, et al. Molecular Diversity of Rabies Viruses Associated with Bats in Mexico and Other Countries of the Americas. *J Clin Microbiol*. 5 de enero de 2006;44(5):1697-710.
8. Organización Panamericana de la Salud. Sistema de Información Epidemiológica (SIEPI) [Internet]. [citado 28 de mayo de 2013]. Recuperado a partir de: <http://siepi2.panaftosa.org.br/>.
9. Rupprecht CE, Briggs D, Brown CM, Franka R, Katz SL, Kerr HD, et al. Use of a reduced (4-dose) vaccine schedule for postexposure prophylaxis to prevent human rabies: recommendations of the advisory committee on immunization practices. *MMWR Recomm Rep Morb Mortal Wkly Rep Recomm Rep Cent Dis Control*. 19 de marzo de 2010;59(RR-2):1-9.
10. Galazka A, Milstein J, Zaffran M. Temperature sensitivity of vaccines [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2006 [citado 30 de enero de 2014]. 62 p. Recuperado a partir de: http://www.path.org/vaccineresources/files/Temp_sensitivity_WHO.pdf

11. Connery B, Wild M. Rabies and Rabies Control in Wildlife: Application to National Park System Areas. 2001.
12. Slate D, Algeo TP, Nelson KM, Chipman RB, Donovan D, Blanton JD, et al. Oral Rabies Vaccination in North America: Opportunities, Complexities, and Challenges. PLoS Negl Trop Dis. 22 de diciembre de 2009;3(12):e549.
13. Müller T, Bätza H-J, Beckert A, Bunzenthal C, Cox JH, Freuling CM, et al. Analysis of vaccine-virus-associated rabies cases in red foxes (*Vulpes vulpes*) after oral rabies vaccination campaigns in Germany and Austria. Arch Virol. 1 de julio de 2009;154(7):1081-91.
14. Hanlon CA, Smith JS, Anderson GR. Special Series—Recommendations of group on prevention and control of rabies in the United States. 11. diciembre de 1999;215:1612-9.
15. Yang D-K, Kim H-H, Lee K-W, Song J-Y. The present and future of rabies vaccine in animals. Clin Exp Vaccine Res. 2013;2(1):19.
16. WHO | Recombinant vaccines for oral immunization of wildlife [Internet]. WHO. [citado 25 de enero de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.who.int/rabies/vaccines/recombinant/en/>
17. Kieny MP, Lathe R, Drillien R, Spehner D, Skory S, Schmitt D, et al. Expression of rabies virus glycoprotein from a recombinant vaccinia virus. Nature. 8 de noviembre de 1984;312(5990):163-6.

18. Brochier B, Aubert MF, Pastoret PP, Masson E, Schon J, Lombard M, et al. Field use of a vaccinia-rabies recombinant vaccine for the control of sylvatic rabies in Europe and North America. *Rev Sci Tech Int Off Epizoot.* septiembre de 1996;15(3):947-70.
19. Charlton KM, Artois M, Prevec L, Campbell JB, Casey GA, Wandeler AI, et al. Oral rabies vaccination of skunks and foxes with a recombinant human adenovirus vaccine. *Arch Virol.* 1 de marzo de 1992;123(1-2):169-79.
20. Zhou M, Zhang G, Ren G, Gnanadurai CW, Li Z, Chai Q, et al. Recombinant Rabies Viruses Expressing GM-CSF or Flagellin Are Effective Vaccines for Both Intramuscular and Oral Immunizations. Turner SJ, editor. *PLoS ONE.* 20 de mayo de 2013;8(5):e63384.
21. Knowles MK, Nadin-Davis SA, Sheen M, Rosatte R, Mueller R, Beresford A. Safety studies on an adenovirus recombinant vaccine for rabies (AdRG1.3-ONRAB®) in target and non-target species. *Vaccine.* 5 de noviembre de 2009;27(47):6619-26.
22. Prevec L, Campbell JB, Christie BS, Belbeck L, Graham FL. A recombinant human adenovirus vaccine against rabies. *J Infect Dis.* enero de 1990;161(1):27-30.
23. Fry TL, VanDalen KK, Duncan C, VerCauteren K. The safety of ONRAB® in select non-target wildlife. *Vaccine [Internet].* [citado 10 de julio de

2013]; Recuperado a partir de:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0264410X13008785>

24. Martínez-Sobrido L, García-Sastre A. Generation of Recombinant Influenza Virus from Plasmid DNA. *J Vis Exp JoVE* [Internet]. 3 de agosto de 2010 [citado 10 de julio de 2013];(42). Recuperado a partir de:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3156010/>

25. Lawson ND, Stillman EA, Whitt MA, Rose JK. Recombinant vesicular stomatitis viruses from DNA. *Proc Natl Acad Sci*. 1995;92(10):4477-81.

26. Roth JP. The Use of Reverse Genetics to Clone and Rescue Infectious, Recombinant Human Parainfluenza Type 3 Viruses. *Grad Theses Diss*. 2009;467.

27. Suzuki R, de Borja L, Duarte dos Santos CN, Mason PW. Construction of an infectious cDNA clone for a Brazilian prototype strain of dengue virus type 1: Characterization of a temperature-sensitive mutation in NS1. *Virology*. 5 de junio de 2007;362(2):374-83.

28. Usme-Ciro JA, Lopera JA, Enjuanes L, Almazán F, Gallego-Gomez JC. Development of a novel DNA-launched dengue virus type 2 infectious clone assembled in a bacterial artificial chromosome. *Virus Res*. 13 de febrero de 2014;180:12-22.

29. Hartman AL, Dover JE, Towner JS, Nichol ST. Reverse Genetic Generation of Recombinant Zaire Ebola Viruses Containing Disrupted IRF-3 Inhibitory Domains Results in Attenuated Virus Growth In Vitro and Higher Levels of IRF-3 Activation without Inhibiting Viral Transcription or Replication. *J Virol.* 7 de enero de 2006;80(13):6430-40.
30. Watanabe S, Watanabe T, Noda T, Takada A, Feldmann H, Jasenosky LD, et al. Production of Novel Ebola Virus-Like Particles from cDNAs: an Alternative to Ebola Virus Generation by Reverse Genetics. *J Virol.* 15 de enero de 2004;78(2):999-1005.
31. Bridgen A. Introduction 1.1. Reverse Genetics of RNA Viruses: Applications and Perspectives. Chichester, West Sussex: John Wiley & Sons; 2013.
32. World Health Organization. WHO Expert Consultation on Rabies First report. [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2005 [citado 13 de octubre de 2013]. 11-15 p. Recuperado a partir de: <http://public.eblib.com/EBLPublic/PublicView.do?ptiID=284794>
33. Menezes R. Rabies in India. *CMAJ Can Med Assoc J.* 26 de febrero de 2008;178(5):564-6.
34. Lee DN, Papes M, Van Den Bussche RA. Present and Potential Future Distribution of Common Vampire Bats in the Americas and the Associated

Risk to Cattle. PLoS ONE [Internet]. 10 de agosto de 2012 [citado 13 de octubre de 2013];7(8). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3416852/>

35. Jemberu WT, Molla W, Almaw G, Alemu S. Incidence of Rabies in Humans and Domestic Animals and People's Awareness in North Gondar Zone, Ethiopia. PLoS Negl Trop Dis. 9 de mayo de 2013;7(5):e2216.

36. Rupprecht CE. Rhabdoviruses: Rabies Virus. En: Baron S, editor. Medical Microbiology [Internet]. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [citado 14 de octubre de 2013]. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8618/>

37. Frenia ML, Lafin SM, Barone JA. Features and treatment of rabies. Clin Pharm. enero de 1992;11(1):37-47.

38. Johnson N, Phillipotts R, Fooks AR. Airborne transmission of lyssaviruses. J Med Microbiol. 6 de enero de 2006;55(6):785-90.

39. Maier T, Schwarting A, Mauer D, Ross RS, Martens A, Kliem V, et al. Management and Outcomes after Multiple Corneal and Solid Organ Transplantations from a Donor Infected with Rabies Virus. Clin Infect Dis. 15 de abril de 2010;50(8):1112-9.

40. Shankar SK, Mahadevan A, Sapico SD, Ghodkirekar MSG, Pinto RGW, Madhusudana SN. Rabies viral encephalitis with probable 25 year incubation period! *Ann Indian Acad Neurol*. 2012;15(3):221-3.
41. Susilawathi NM, Darwinata AE, Dwija IB, Budayanti NS, Wirasandhi GA, Subrata K, et al. Epidemiological and clinical features of human rabies cases in Bali 2008-2010. *BMC Infect Dis*. 2 de abril de 2012;12:81.
42. WHO | Rabies [Internet]. WHO. [citado 14 de agosto de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/en/>
43. Willoughby RE, Tieves KS, Hoffman GM, Ghanayem NS, Amlie-Lefond CM, Schwabe MJ, et al. Survival after Treatment of Rabies with Induction of Coma. *N Engl J Med*. 2005;352(24):2508-14.
44. Albertini AAV, Ruigrok RWH, Blondel D. Chapter 1 - Rabies Virus Transcription and Replication. En: Alan C. Jackson, editor. *Advances in Virus Research* [Internet]. Academic Press; 2011 [citado 14 de octubre de 2013]. p. 1-22. Recuperado a partir de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123870407000019>
45. Rupprecht CE. Rhabdoviruses: Rabies Virus. En: Baron S, editor. *Medical Microbiology* [Internet]. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996 [citado 14 de octubre de 2013]. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK8618/>

46. Knipe DM, Howley PM. *Fields' Virology*. Lippincott Williams & Wilkins; 2007. 1650 p.
47. Okumura A, Harty RN. Rabies Virus Assembly and Budding. *Advances in Virus Research* [Internet]. Elsevier; 2011 [citado 28 de enero de 2014]. p. 23-32. Recuperado a partir de: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780123870407000020>
48. Yousaf MZ, Qasim M, Zia S, Rehman Khan M ur, Ashfaq UA, Khan S. Rabies molecular virology, diagnosis, prevention and treatment. *Viol J*. 21 de febrero de 2012;9:50.
49. Thoulouze M-I, Lafage M, Schachner M, Hartmann U, Cremer H, Lafon M. The Neural Cell Adhesion Molecule Is a Receptor for Rabies Virus. *J Virol*. septiembre de 1998;72(9):7181-90.
50. Hotta K, Bazartseren B, Kaku Y, Noguchi A, Okutani A, Inoue S, et al. Effect of cellular cholesterol depletion on rabies virus infection. *Virus Res*. enero de 2009;139(1):85-90.
51. Moore SM, Hanlon CA. Rabies-Specific Antibodies: Measuring Surrogates of Protection against a Fatal Disease. *PLoS Negl Trop Dis*. 9 de marzo de 2010;4(3):e595.

52. Iseñi F, Barge A, Baudin F, Blondel D, Ruigrok RW. Characterization of rabies virus nucleocapsids and recombinant nucleocapsid-like structures. *J Gen Virol.* 1 de diciembre de 1998;79(12):2909-19.
53. Albertini AAV, Wernimont AK, Muziol T, Ravelli RBG, Clapier CR, Schoehn G, et al. Crystal Structure of the Rabies Virus Nucleoprotein-RNA Complex. *Science.* 21 de julio de 2006;313(5785):360-3.
54. Thomas D, Newcomb WW, Brown JC, Wall JS, Hainfeld JF, Trus BL, et al. Mass and molecular composition of vesicular stomatitis virus: a scanning transmission electron microscopy analysis. *J Virol.* mayo de 1985;54(2):598-607.
55. Emerson SU, Schubert M. Location of the binding domains for the RNA polymerase L and the ribonucleocapsid template within different halves of the NS phosphoprotein of vesicular stomatitis virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* agosto de 1987;84(16):5655-9.
56. Kolakofsky D, Le Mercier P, Iseñi F, Garcin D. Viral RNA polymerase scanning and the gymnastics of Sendai virus RNA synthesis. *Virology.* 20 de enero de 2004;318(2):463-73.
57. Neumann G, Whitt MA, Kawaoka Y. A decade after the generation of a negative-sense RNA virus from cloned cDNA—what have we learned? *J Gen Virol.* 2002;83(11):2635-62.

58. Mebatsion T, Schnell MJ, Cox JH, Finke S, Conzelmann K-K. Highly stable expression of a foreign gene from rabies virus vectors. *Proc Natl Acad Sci.* 1996;93(14):7310-4.
59. Kolakofsky D. Isolation of vesicular stomatitis virus defective interfering genomes with different amounts of 5'-terminal complementarity. *J Virol.* febrero de 1982;41(2):566-74.
60. Liu P. Rabies virus N, P and RNA interactions in vivo and mapping the functional domains of N in NP and NN interactions. 2004 [citado 14 de octubre de 2013]; Recuperado a partir de: <http://atheneum.libs.uga.edu/handle/10724/7781>
61. Wertz GW, Perepelitsa VP, Ball LA. Gene rearrangement attenuates expression and lethality of a nonsegmented negative strand RNA virus. *Proc Natl Acad Sci.* 1998;95(7):3501-6.
62. Finke S, Cox JH, Conzelmann K-K. Differential Transcription Attenuation of Rabies Virus Genes by Intergenic Regions: Generation of Recombinant Viruses Overexpressing the Polymerase Gene. *J Virol.* 15 de agosto de 2000;74(16):7261-9.
63. Finke S, Conzelmann K-K. Dissociation of Rabies Virus Matrix Protein Functions in Regulation of Viral RNA Synthesis and Virus Assembly. *J Virol.* noviembre de 2003;77(22):12074-82.

64. Yang J, Koprowski H, Dietzschold B, Fu ZF. Phosphorylation of Rabies Virus Nucleoprotein Regulates Viral RNA Transcription and Replication by Modulating Leader RNA Encapsidation. *J Virol.* febrero de 1999;73(2):1661-4.
65. Finke S, Conzelmann KK. Ambisense gene expression from recombinant rabies virus: random packaging of positive- and negative-strand ribonucleoprotein complexes into rabies virions. *J Virol.* octubre de 1997;71(10):7281-8.
66. Mavrakis M, Méhouas S, Réal E, Iseni F, Blondel D, Tordo N, et al. Rabies virus chaperone: Identification of the phosphoprotein peptide that keeps nucleoprotein soluble and free from non-specific RNA. *Virology.* 5 de junio de 2006;349(2):422-9.
67. Finke S, Granzow H, Hurst J, Pollin R, Mettenleiter TC. Intergenotypic Replacement of Lyssavirus Matrix Proteins Demonstrates the Role of Lyssavirus M Proteins in Intracellular Virus Accumulation. *J Virol.* febrero de 2010;84(4):1816-27.
68. Wirblich C, Tan GS, Papaneri A, Godlewski PJ, Orenstein JM, Harty RN, et al. PPEY Motif within the Rabies Virus (RV) Matrix Protein Is Essential for Efficient Virion Release and RV Pathogenicity. *J Virol.* 10 de enero de 2008;82(19):9730-8.

69. Chen BJ, Lamb RA. Mechanisms for enveloped virus budding: Can some viruses do without an ESCRT? *Virology*. 15 de marzo de 2008;372(2):221-32.
70. Mani RS, Madhusudana SN. Laboratory Diagnosis of Human Rabies: Recent Advances. *Sci World J*. 2013;2013:1-10.
71. Fischer M, Wernike K, Freuling CM, Muller T, Aylan O, Brochier B, et al. A Step Forward in Molecular Diagnostics of Lyssaviruses - Results of a Ring Trial among European Laboratories. *PLoS ONE* [Internet]. 8 de marzo de 2013 [citado 14 de octubre de 2013];8(3). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3592807/>
72. The World Organisation for Animal Health (OIE). Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. Chapter 2.1.13: Rabies. [Internet]. 2013 [citado 14 de octubre de 2013]. Recuperado a partir de: <http://www.oie.int/international-standard-setting/terrestrial-manual/access-online/>
73. Meslin F-X, Kaplan MM, Koprowski H. Laboratory techniques in rabies [Internet]. World Health Organization Geneva; 1996 [citado 26 de enero de 2014]. Recuperado a partir de: http://libdoc.who.int/publications/1996/9241544791_eng.pdf

74. Heaton PR, McElhinney LM, Lowings JP. Detection and identification of rabies and rabies-related viruses using rapid-cycle PCR. *J Virol Methods*. agosto de 1999;81(1-2):63-9.
75. Kasempimolporn S, Saengseesom W, Lumlertdacha B, Sitprija V. Detection of Rabies Virus Antigen in Dog Saliva Using a Latex Agglutination Test. *J Clin Microbiol*. agosto de 2000;38(8):3098-9.
76. Wacharapluesadee S, Phumesin P, Supavonwong P, Khawplod P, Intarut N, Hemachudha T. Comparative detection of rabies RNA by NASBA, real-time PCR and conventional PCR. *J Virol Methods*. agosto de 2011;175(2):278-82.
77. Bastien P, Procop GW, Reischl U. Quantitative Real-Time PCR Is Not More Sensitive than «Conventional» PCR. *J Clin Microbiol*. 6 de enero de 2008;46(6):1897-900.
78. Biswal M, Ratho RK, Mishra B. Role of reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of human rabies. *Indian J Med Res*. junio de 2012;135(6):837-42.
79. David D. Role of the RT-PCR method in ante-mortem & post-mortem rabies diagnosis. *Indian J Med Res*. junio de 2012;135(6):809-11.
80. Aravindh Babu RP, Manoharan S, Ramadass P, Chandran NDJ. Evaluation of RT-PCR Assay for Routine Laboratory Diagnosis of Rabies in

Post Mortem Brain Samples from Different Species of Animals. *Indian J Virol.* 25 de septiembre de 2012;23(3):392-6.

81. Yang D-K, Shin E-K, Oh Y-I, Lee K-W, Lee C-S, Kim S-Y, et al. Comparison of four diagnostic methods for detecting rabies viruses circulating in Korea. *J Vet Sci.* marzo de 2012;13(1):43-8.

82. Favoretto SR, Martorelli LFA, Elkhoury MR, Zargo AM, Durigon EL. Rabies Virus Detection and Phylogenetic Studies in Samples from an Exhumed Human. *Clin Infect Dis.* 8 de enero de 2005;41(3):413-4.

83. Smith KA. Louis Pasteur, the Father of Immunology? *Front Immunol* [Internet]. 10 de abril de 2012 [citado 1 de septiembre de 2014];3. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3342039/>

84. Schneider MC, Santos-Burgoa C. Tratamiento contra la rabia humana: un poco de su historia. *Rev Saude Publica.* 1994;28(6):454-63.

85. Okonko Iheanyi Omezuruike ODE. Rabies Vaccines: Its Role, Challenges, Considerations and Implications for the Global Control and Possible Eradication of Rabies. *Int J Anim Vet Adv.* 2010;2(4).

86. Wunner WH, Jackson AC. Rabies: Scientific Basis of the Disease and Its Management. Academic Press; 2010. 682 p.

87. Kissling RE. Growth of rabies virus in non-nervous tissue culture. Proc Soc Exp Biol Med Soc Exp Biol Med N Y N. junio de 1958;98(2):223-5.
88. R. Branche. Chapter 25: Vaccine for humans prepare in human diploid cells. Laboratory techniques in rabies [Internet]. World Health Organization Geneva; 1996 [citado 3 de septiembre de 2014]. Recuperado a partir de: http://libdoc.who.int/publications/1996/9241544791_eng.pdf
89. B. Montagnon, B. Fanget. Chapter 26: Purified Vero cell Vaccine for humans. Laboratory techniques in rabies [Internet]. World Health Organization Geneva; 1996 [citado 3 de septiembre de 2014]. Recuperado a partir de: http://libdoc.who.int/publications/1996/9241544791_eng.pdf
90. Ahringer J. Reverse genetics. WormBook: The Online Review of C elegans Biology [Internet] [Internet]. Pasadena (CA): WormBook; 2006 [citado 19 de enero de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19711/>
91. Goff SP, Berg P. Construction of hybrid viruses containing SV40 and lambda phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells. Cell. diciembre de 1976;9(4 PT 2):695-705.
92. Taniguchi T, Palmieri M, Weissmann C. A Qbeta DNA-containing hybrid plasmid giving rise to Qbeta phage formation in the bacterial host [proceedings]. Ann Microbiol (Paris). diciembre de 1978;129 B(4):535-6.

93. Ahlquist P, French R, Janda M, Loesch-Fries LS. Multicomponent RNA plant virus infection derived from cloned viral cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. noviembre de 1984;81(22):7066-70.
94. Dawson WO, Beck DL, Knorr DA, Grantham GL. cDNA cloning of the complete genome of tobacco mosaic virus and production of infectious transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. marzo de 1986;83(6):1832-6.
95. Sasaki J, Kusuhara Y, Maeno Y, Kobayashi N, Yamashita T, Sakae K, et al. Construction of an Infectious cDNA Clone of Aichi Virus (a New Member of the Family Picornaviridae) and Mutational Analysis of a Stem-Loop Structure at the 5' End of the Genome. *J Virol*. septiembre de 2001;75(17):8021-30.
96. Gal-On A, Antignus Y, Rosner A, Raccach B. Infectious in vitro RNA transcripts derived from cloned cDNA of the cucurbit potyvirus, zucchini yellow mosaic virus. *J Gen Virol*. 1991;72(11):2639-43.
97. Meshi T, Ishikawa M, Motoyoshi F, Semba K, Okada Y. In vitro transcription of infectious RNAs from full-length cDNAs of tobacco mosaic virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. julio de 1986;83(14):5043-7.
98. Vos P, Jaegle M, Wellink J, Verver J, Eggen R, Van Kammen A, et al. Infectious RNA transcripts derived from full-length DNA copies of the genomic RNAs of cowpea mosaic virus. *Virology*. julio de 1988;165(1):33-41.

99. Boyer J-C, Haenni A-L. Infectious Transcripts and cDNA Clones of RNA Viruses. *Virology*. 1 de febrero de 1994;198(2):415-26.
100. Werf S van der, Bradley J, Wimmer E, Studier FW, Dunn JJ. Synthesis of infectious poliovirus RNA by purified T7 RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci*. 4 de enero de 1986;83(8):2330-4.
101. Heaton LA, Carrington JC, Morris TJ. Turnip crinkle virus infection from RNA synthesized in vitro. *Virology*. mayo de 1989;170(1):214-8.
102. Wimmer E. The test-tube synthesis of a chemical called poliovirus: The simple synthesis of a virus has far-reaching societal implications. *EMBO Rep*. julio de 2006;7(Spec No):S3-9.
103. Racaniello VR, Baltimore D. Cloned poliovirus complementary DNA is infectious in mammalian cells. *Science*. 214(4523):916-9.
104. Schnell MJ, Mebatsion T, Conzelmann K-K. Infectious rabies viruses from cloned cDNA. *EMBO J*. 1994;13(18):4195.
105. Warfield KL, Aman MJ. Advances in Virus-Like Particle Vaccines for Filoviruses. *J Infect Dis*. 10 de octubre de 2011;204(suppl 3):S1053-9.
106. Jiang Y, Liu H, Liu P, Kong X. Plasmids driven minigenome rescue system for Newcastle disease virus V4 strain. *Mol Biol Rep*. 1 de septiembre de 2009;36(7):1909-14.

107. Le Mercier P, Jacob Y, Tanner K, Tordo N. A Novel Expression Cassette of Lyssavirus Shows that the Distantly Related Mokola Virus Can Rescue a Defective Rabies Virus Genome. *J Virol.* febrero de 2002;76(4):2024-7.
108. Tao L, Ge J, Wang X, Wen Z, Zhai H, Hua T, et al. Generation of a recombinant rabies Flury LEP virus carrying an additional G gene creates an improved seed virus for inactivated vaccine production. *Virology.* 25 de septiembre de 2011;8:454.
109. Flatz L, Bergthaler A, de la Torre JC, Pinschewer DD. Recovery of an arenavirus entirely from RNA polymerase I/II-driven cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 21 de marzo de 2006;103(12):4663-8.
110. Emonet SE, Urata S, de la Torre JC. Arenavirus Reverse Genetics: New Approaches for the Investigation of Arenavirus Biology and Development of Antiviral Strategies. *Virology.* 15 de marzo de 2011;411(2):416-25.
111. Marschalek A, Finke S, Schwemmler M, Mayer D, Heimrich B, Stitz L, et al. Attenuation of Rabies Virus Replication and Virulence by Picornavirus Internal Ribosome Entry Site Elements. *J Virol.* 10 de diciembre de 2008;83(4):1911-9.
112. Hoenen T, Groseth A, de Kok-Mercado F, Kuhn JH, Wahl-Jensen V. MINIGENOMES, TRANSCRIPTION AND REPLICATION COMPETENT

VIRUS-LIKE PARTICLES AND BEYOND: REVERSE GENETICS SYSTEMS FOR FILOVIRUSES AND OTHER NEGATIVE STRANDED HEMORRHAGIC FEVER VIRUSES. *Antiviral Res.* agosto de 2011;91(2):195-208.

113. Kuan W-L, Poole E, Fletcher M, Karniely S, Tyers P, Wills M, et al. A novel neuroprotective therapy for Parkinson's disease using a viral noncoding RNA that protects mitochondrial Complex I activity. *J Exp Med.* 16 de enero de 2012;209(1):1-10.

114. Liu Y, Guo Y, An S, Kuang Y, He X, Ma H, et al. Targeting Caspase-3 as Dual Therapeutic Benefits by RNAi Facilitating Brain-Targeted Nanoparticles in a Rat Model of Parkinson's Disease. *PLoS ONE* [Internet]. 13 de mayo de 2013 [citado 19 de enero de 2014];8(5). Recuperado a partir de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3652845/>

115. Kumar P, Wu H, McBride JL, Jung K-E, Hee Kim M, Davidson BL, et al. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. *Nature.* 17 de junio de 2007;448(7149):39-43.

116. Klingen Y, Conzelmann K-K, Finke S. Double-Labeled Rabies Virus: Live Tracking of Enveloped Virus Transport. *J Virol.* 10 de octubre de 2007;82(1):237-45.

117. Wickersham IR, Lyon DC, Barnard RJO, Mori T, Finke S, Conzelmann K-K, et al. Monosynaptic Restriction of Transsynaptic Tracing from Single, Genetically Targeted Neurons. *Neuron*. 1 de marzo de 2007;53(5):639-47.
118. Zhao W, Hu H, Zsak L, Yu Q, Yang Z. Application of the ligation-independent cloning (LIC) method for rapid construction of a minigenome rescue system for Newcastle disease virus VG/GA strain. *Plasmid*. noviembre de 2013;70(3):314-20.
119. Ghanem A, Kern A, Conzelmann K-K. Significantly improved rescue of rabies virus from cDNA plasmids. *Eur J Cell Biol*. enero de 2012;91(1):10-6.
120. Ito N, Takayama M, Yamada K, Sugiyama M, Minamoto N. Rescue of Rabies Virus from Cloned cDNA and Identification of the Pathogenicity-Related Gene: Glycoprotein Gene Is Associated with Virulence for Adult Mice. *J Virol*. octubre de 2001;75(19):9121-8.
121. Ghanem A, Conzelmann K-K. Reverse Genetics of Rhabdoviruses. En: Bridgen A, editor. *Reverse Genetics of RNA Viruses* [Internet]. John Wiley & Sons, Ltd; 2012 [citado 25 de enero de 2014]. p. 113-49. Recuperado a partir de: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/9781118405338.ch5/summary>
122. Hoenen T, Jung S, Herwig A, Groseth A, Becker S. Both matrix proteins of Ebola virus contribute to the regulation of viral genome replication and transcription. *Virology*. 20 de julio de 2010;403(1):56-66.

123. Inoue K, Shoji Y, Kurane I, Iijima T, Sakai T, Morimoto K. An improved method for recovering rabies virus from cloned cDNA. *J Virol Methods*. febrero de 2003;107(2):229-36.

124. Pattnaik AK, Andrew Ball L, LeGrone AW, Wertz GW. Infectious defective interfering particles of VSV from transcripts of a cDNA clone. *Cell*. 1992;69(6):1011-20.

125. Dersch P, Fsihi H, Bremer E. Low-copy-number T7 vectors for selective gene expression and efficient protein overproduction in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 1994;123(1):19-26.

126. Palese P, Zheng H, Engelhardt OG, Pleschka S, García-Sastre A. Negative-strand RNA viruses: genetic engineering and applications. *Proc Natl Acad Sci*. 1996;93(21):11354-8.

127. Ogawa Y, Sugiura K, Kato K, Tohya Y, Akashi H. Rescue of Akabane virus (family Bunyaviridae) entirely from cloned cDNAs by using RNA polymerase I. *J Gen Virol*. 12 de enero de 2007;88(12):3385-90.

128. Ito N, Takayama-Ito M, Yamada K, Hosokawa J, Sugiyama M, Minamoto N. Improved Recovery of Rabies Virus from Cloned cDNA Using a Vaccinia Virus-Free Reverse Genetics System. *Microbiol Immunol*. 2003;47(8):613-7.

129. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press; 2001. 1365 p.
130. Rahman MT, Uddin MS, Sultana R, Moue A, Setu M. Polymerase Chain Reaction (PCR): A Short Review. *Anwer Khan Mod Med Coll J*. 2013;4(1):30-6.
131. Miko I, Ilona L. 4.3 Scientists Can Make Copies of a Gene through PCR. *Essentials of Genetics* [Internet]. Cambridge, MA: NPG Education; 2009 [citado 8 de mayo de 2014]. Recuperado a partir de: <http://www.nature.com/scitable/ebooks/essentials-of-genetics-8/118522915>
132. Harbers M. The current status of cDNA cloning. *Genomics*. marzo de 2008;91(3):232-42.
133. Pingoud A, Fuxreiter M, Pingoud V, Wende W. Type II restriction endonucleases: structure and mechanism. *Cell Mol Life Sci*. marzo de 2005;62(6):685-707.
134. Pingoud A, Jeltsch A. Structure and function of type II restriction endonucleases. *Nucleic Acids Res*. 15 de septiembre de 2001;29(18):3705-27.
135. Szybalski W, Kim SC, Hasan N, Podhajski AJ. Class-II restriction enzymes — a review. *Gene*. abril de 1991;100:13-26.

136. Ling MM, Robinson BH. Approaches to DNA mutagenesis: an overview. *Anal Biochem.* 1997;254(2):157-78.
137. Yount B, Denison MR, Weiss SR, Baric RS. Systematic Assembly of a Full-Length Infectious cDNA of Mouse Hepatitis Virus Strain A59. *J Virol.* 11 de enero de 2002;76(21):11065-78.
138. Carroll WL. Introduction to recombinant-DNA technology. *Am J Clin Nutr.* agosto de 1993;58(2 Suppl):249S - 258S.
139. Oswald N. The Basics: How Does DNA Ligation Work? [Internet]. Bitesize Bio. [citado 15 de abril de 2014]. Recuperado a partir de: <http://bitesizebio.com/10279/the-basics-how-does-dna-ligation-work/>
140. França LTC, Carrilho E, Kist TBL. A review of DNA sequencing techniques. *Q Rev Biophys* [Internet]. mayo de 2002 [citado 25 de agosto de 2014];35(02). Recuperado a partir de: http://www.journals.cambridge.org/abstract_S0033583502003797
141. Daugelaite J, O' Driscoll A, Sleator RD. An Overview of Multiple Sequence Alignments and Cloud Computing in Bioinformatics. *Int Sch Res Not.* 14 de agosto de 2013;2013:e615630.
142. Salazar G, Chavez A, et al. Implementación de tecnologías para la producción de Vacunas Pentavalente, Vacuna Antirrábica Humana y Vacuna

Antirrábica Veterinaria en Sustrato Celular. Ecuador - Guayaquil: Instituto Nacional de Higiene y Medicina Tropical, Leopoldo Izquieta; 2009.

143. Anishchenko M, Paessler S, Greene IP, Aguilar PV, Carrara A-S, Weaver SC. Generation and Characterization of Closely Related Epizootic and Enzootic Infectious cDNA Clones for Studying Interferon Sensitivity and Emergence Mechanisms of Venezuelan Equine Encephalitis Virus. *J Virol.* enero de 2004;78(1):1-8.

144. Payne AJ, Gerdes BC, Kaja S, Koulen P. Insert sequence length determines transfection efficiency and gene expression levels in bicistronic mammalian expression vectors. *Int J Biochem Mol Biol.* 15 de diciembre de 2013;4(4):201-8.

145. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* abril de 1987;162(1):156-9.

146. Nadin-Davis SA, Sheen M, Wandeler AI. Development of real-time reverse transcriptase polymerase chain reaction methods for human rabies diagnosis. *J Med Virol.* 2009;81(8):1484-97.

147. Zhou M-Y, Gomez-Sanchez CE. Universal TA cloning. *Curr Issues Mol Biol.* 2000;2(1):2000-1.

148. Untergasser A, Cutcutache I, Koressaar T, Ye J, Faircloth BC, Remm M, et al. Primer3--new capabilities and interfaces. *Nucleic Acids Res.* agosto de 2012;40(15):e115.
149. Wickersham IR, Sullivan HA, Seung HS. Production of glycoprotein-deleted rabies viruses for monosynaptic tracing and high-level gene expression in neurons. *Nat Protoc.* 4 de marzo de 2010;5(3):595-606.
150. Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol.* octubre de 2011;28(10):2731-9.
151. Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* julio de 1987;4(4):406-25.
152. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol.* mayo de 1993;10(3):512-26.
153. Wang L, Cao S, Du J, Dong G, Tang Q. Sequencing of complete genome of rabies virus CVS-11 strain. 2010;23:455-9.
154. Wirblich C, Schnell MJ. Rabies Virus (RV) Glycoprotein Expression Levels Are Not Critical for Pathogenicity of RV. *J Virol.* 10 de noviembre de 2010;85(2):697-704.

155. Jiao W, Yin X, Li Z, Lan X, Li X, Tian X, et al. Molecular characterization of China rabies virus vaccine strain. *Virology*. 2011;17(8):521.
156. Zhang G, Wang H, Mahmood F, Fu ZF. Rabies virus glycoprotein is an important determinant for the induction of innate immune responses and the pathogenic mechanisms. *Veterinary Microbiology*. marzo de 2013;162(2-4):601-13.
157. Tao X, Han N, Guo Z, Tang Q, Rayner S, Liang G. Molecular characterization of China human rabies vaccine strains. *Virology Sinica*. 11 de abril de 2013;28(2):116-23.
158. Quinn PJ, Markey BK, Leonard FC, Hartigan P, Fanning S, FitzPatrick ES. Replication of RNA viruses. *Veterinary Microbiology and Microbial Disease*. John Wiley & Sons; 2011.
159. Cary E. Schaechter's Mechanisms of Microbial Disease. Lippincott Williams & Wilkins; 2012. 847 p.
160. Rennick LJ, Duprex WP, Rima BK. Measles virus minigenomes encoding two autofluorescent proteins reveal cell-to-cell variation in reporter expression dependent on viral sequences between the transcription units. *Journal of General Virology*. 10 de enero de 2007;88(10):2710-8.
161. Gómez-Puertas P, Mena I, Castillo M, Vivo A, Pérez-Pastrana E, Portela A. Efficient formation of influenza virus-like particles: dependence on

the expression levels of viral proteins. *J Gen Virol.* julio de 1999;80 (Pt 7):1635-45.

162. Freiberg A, Dolores LK, Enterlein S, Flick R. Establishment and characterization of plasmid-driven minigenome rescue systems for Nipah virus: RNA Polymerase I- and T7-catalyzed generation of functional paramyxoviral RNA. *Virology.* 5 de enero de 2008;370(1):33-44.

163. Shimizu K, Ito N, Mita T, Yamada K, Hosokawa-Muto J, Sugiyama M, et al. Involvement of nucleoprotein, phosphoprotein, and matrix protein genes of rabies virus in virulence for adult mice. *Virus Res.* febrero de 2007;123(2):154-60.

164. Lei Y-L, Wang X-G, Tao X-Y, Li H, Meng S-L, Chen X-Y, et al. [Sequencing and analysis of complete genome of rabies viruses isolated from Chinese Ferret-Badger and dog in Zhejiang province]. *Bing Xue Bao Chin J Virol Bian Ji Bing Xue Bao Bian Ji Wei Yuan Hui.* enero de 2010;26(1):45-52.

165. Guo L, Feng N, Yang S, Wang X, Ge J, Xia X, et al. [Reverse genetic system for rabies virus vaccine Evelyn-Rokitnicki-Abelseth strain]. *Wei Sheng Wu Xue Bao.* julio de 2009;49(7):949-54.

166. Shi L, Yu Y, Liu J, Tang J, Wu X, Cao S, et al. [Analysis of full-length gene sequence of a rabies vaccine strain CTN-1 for human use in China].

Bing Xue Bao Chin J Virol Bian Ji Bing Xue Bao Bian Ji Wei Yuan Hui. mayo de 2010;26(3):195-201.

167. He C-Q, Meng S-L, Yan H-Y, Ding N-Z, He H-B, Yan J-X, et al. Isolation and Identification of a Novel Rabies Virus Lineage in China with Natural Recombinant Nucleoprotein Gene. PLoS ONE. 4 de diciembre de 2012;7(12):e49992.

168. Tao L, Ge J, Wang X, Zhai H, Hua T, Zhao B, et al. Molecular Basis of Neurovirulence of Flury Rabies Virus Vaccine Strains: Importance of the Polymerase and the Glycoprotein R333Q Mutation. J Virol. septiembre de 2010;84(17):8926-36.

169. Zhang G, Fu ZF. Complete Genome Sequence of a Street Rabies Virus from Mexico. J Virol. 10 de septiembre de 2012;86(19):10892-3.

170. Kuzmin IV, Shi M, Orciari LA, Yager PA, Velasco-Villa A, Kuzmina NA, et al. Molecular Inferences Suggest Multiple Host Shifts of Rabies Viruses from Bats to Mesocarnivores in Arizona during 2001–2009. PLoS Pathog. 21 de junio de 2012;8(6):e1002786.

171. Zhang J, Zhang H, Tao X, Li H, Tang Q, Jiang X, et al. The full-length genome analysis of a street rabies virus strain isolated in Yunnan province of China. Virol Sin. junio de 2012;27(3):204-13.

172. Marston DA, McElhinney LM, Ellis RJ, Horton DL, Wise EL, Leech SL, et al. Next generation sequencing of viral RNA genomes. *BMC Genomics*. 4 de julio de 2013;14(1):444.