



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
*Universidad Nacional Autónoma de
México*

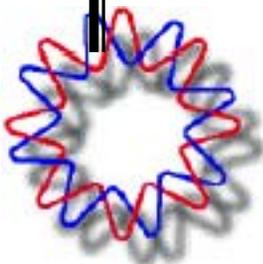
**DESARROLLO DE ESTRATEGIAS
RACIONALES DE PRODUCCION DE
PSEUDO-PARTICULAS VIRALES EN EL
SISTEMA DE CELULAS DE INSECTO-
BACULOVIRUS**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

P R E S E N T A

M.C. YIMI ALEXANDER MENA MENDEZ



Cuernavaca, Morelos.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera en el Laboratorio del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de una beca de doctorado otorgada por la Dirección General de Estudios de Postgrado-UNAM. Además se contó con apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través de los proyectos PAPIIT UNAM IN223805 y IN206407-3, del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Gobierno del Estado de Morelos (proyecto CONACYT-MORELOS MOR-2004-CO2-46225), de CONACYT SAGARPA (CONACYT SAGARPA 2004-CO1-103), y SEP-CONACYT (proyecto SEP-CONACYT 46225-Z).

Aun no logro definirte,
y ya decidí no hacerlo.
Porque cada día, cada día,
cada grandioso día, te amo mas,
A la vez que cada día me sorprendes mas.
Para ti Ingrid

Esta tesis esta dedicada a:

Violeta y a Santiago, que aunque no han nacido, los estamos esperando.

A mi madre Aurora, mi padre Sofonías y mi hermano Jonny.

A toda la familia Mena, la familia Méndez y la familia Lozada Angulo.

Agradecimientos

A la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera por su apoyo incondicional, tanto en lo personal, como en lo académico durante mi formación en el Instituto de Biotecnología-UNAM.

Al Dr. Octavio T. Ramírez por sus sabios consejos y advertencias. Muchas gracias Doc.

A los miembros del mi comité tutorial por su guía y consejos y durante este proyecto

Dr. Carlos Arias

Dr. Jaime Ortega

A los miembros del Jurado, por su interés y comentarios

Dra. Laura A. Palomares Aguilera

Dr. Agustín López Murguía

Dr. Enrique Rudiño

Dra. Ernesto Méndez

Dr. Ramón González

A el apoyo técnico recibido durante la ejecución de este proyecto de doctorado por las siguientes personas e instituciones:

Unidad de microscopía electrónica del Instituto de Fisiología-UNAM.

Dra. Rosana Sánchez y Dra. Guadalupe Zavala por su apoyo en la Unidad de microscopia del IBt-UNAM.

M. en C. Ana Ruth Pastor por su apoyo en las cinéticas de producción y proceso de purificación.

M. en C. Erika Melchy por su apoyo técnico en la unidad de citometría de flujo.

Dr. Marco Rito-Palomares, Dra. Mayra Cisneros-Ruiz y Dr Jorge Benavides por su colaboración en la implementación de los sistemas de fases acuosas. .

Ing. Ricardo Castro e Ing. Grisel Cruz por su apoyo durante sus estancias dentro del programa “Verano de la investigación científica” de la Academia mexicana de ciencias.

Especial agradecimiento a Gloria Villa, Maribel Velasco e Ing. Jalil Saab de la Unidad de Docencia IBt-UNAM, por su gran apoyo durante mis estudios de maestría y doctorado. Ya se libraron de mi.

Gracias a Karin Levy, M. en C. Vanessa Hernández y Javier Dorantes por su apoyo logístico durante mi estancia en el laboratorio.

Gracias a mis queridos compañeros y amigos, William “josemiel” Rodríguez, Juan Carlos “carlitros” Pérez Monter, Alvaro “el chileno” Diaz, Santiago, German “el cuervo” Plasencia, Ricardo “minimi” Castro, Lilí Gallo, Mauricio “maudacio” Barrón, Julio Cesar y Sara “los mivi”, Luís Caspeta, Antonino Báez, Andres Saralegui, matrimonio Navarrete, Romeli, Corina, la banda del CIE y los miembros del grupo Galindo.

TABLA DE CONTENIDOS

Indice de figuras	iv
Indice de tablas	vi
Indice de ecuaciones	vii
Nomenclatura	viii
Resumen	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1. Pseudo-partículas virales (PPV)	5
2.1.1. Ensamblaje de las PPV	5
2.1.2. Expresión recombinante PPV	7
2.1.3. Rotavirus. estructura y morfología.	8
2.2. Sistema células de insecto-baculovirus (CI-BV)	10
2.2.1. Baculovirus	11
2.2.2. Células de insecto	14
2.2.3. Parámetros del sistema CI-BV. Multiplicidad de infección, tiempo de infección	15
2.2.4. Expresión de PPV en el sistema CI-BV	17
3. Objetivos	
3.1. Objetivo general	19
3.2. Objetivos específicos	19
4. Materiales y Métodos	21
4.1. Línea celular	21
4.2. Baculovirus recombinantes	21
4.3. Cultivos de células en suspensión	22
4.4. Métodos analíticos	22
4.4.1. Determinación de concentración y viabilidad celular	22
4.4.2. Cuantificación de VP6 y GFPVP2	22
4.4.3. Cuantificación de pseudo-partículas virales	23
4.4.4. Geles de poliacrilamida y “western blotting”	23

4.5. Mediciones mediante dispersión estática de luz	24
4.5.1. Ensamblaje y desensamblaje de VP6	24
4.5.2. Ensamblaje y desensamblaje de 2/6 PPV	25
4.6. Anisotropía de fluorescencia	25
4.7. Microscopía electrónica	26
4.8. Consideraciones matemáticas	26
4.8.1. Análisis matemático del ensamblaje y desensamblaje de VP6 y 2/6 PPV	26
5. Resultados y discusión	27
5.1. Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. (2006) Jimmy A. Mena, Octavio T. Ramírez, Laura A. Palomares. Journal of Biotechnology 122: 443–452	29
5.2. Analysis and quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography. (2005). Jimmy A. Mena, Octavio T. Ramírez, Laura A. Palomares. Journal of Chromatography B. 824: 267-276.	40
5.3. Rotavirus-like particles primary recovery from insect cells in aqueous two-phase systems. Jorge Benavides*, Jimmy A. Mena*, Mayra Cisneros-Ruiz, Octavio T. Ramírez, Laura A. Palomares, Marco Rito-Palomares. (2006) Journal of Chromatography B 842: 48-57. * Both author contributed equally to this work	51
5.4. Desarrollo de estrategias de purificación de 2/6 PPV y VP6 producidas en el sistema CI-BV	62
5.4.1. Purificación de VP6	62
5.4.2. Purificación de 2/6 PPV	66
5.5. Estudio <i>in vitro</i> del ensamblaje y desensamblaje de PPV de rotavirus.	71
5.5.1. Desensamblaje y ensamblaje de VP6	71
5.5.2. Desensamblaje y ensamblaje de 2/6 PPV	80
5.6. Population kinetics during simultaneous infection of insect cells with two different recombinant baculoviruses for the production of rotavirus-like particles. Jimmy A. Mena, Octavio T. Ramírez, and Laura A. Palomares. Biotechnology BMC. Aceptado	88

5.7. Estudio cinético de producción de las proteínas estructurales GFPVP2, VP6 y 2/6 PPV a diferentes MDI y relaciones de MDI de los baculovirus (bacGFPVP2 y bacVP6)	121
5.7.1. Producción de GFPVP2 a diferentes MDI	121
5.7.2. Producción de VP6 a diferentes MDI	124
5.7.3. Producción de 2/6 PPV mediante la coinfección con bacGFPVP2 y bacVP6 a diferentes MDI	129
6. Conclusiones	136
8. Bibliografía	140

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Estructura del rotavirus.	8
Figura 2.2. Célula de insecto infectada con baculovirus a 48 horas-post infección.	12
Figura 2.3. Ciclo viral del baculovirus en la célula de insecto.	13
Figura 2.4. Distribución de Poisson.	16
Figura 5.1. Esquema de purificación de VP6.	62
Figura 5.2. Cromatogramas típicos de la purificación de VP6.	63
Figura 5.3. Análisis del proceso de purificación de VP6.	64
Figura 5.4. Tubulos de VP6 obtenidos mediante el proceso de purificación planteado.	65
Figura 5.5. Esquema de purificación de 2/6 PPV del sobrenadante.	67
Figura 5.6. Cromatograma de la etapa de permeación en gel de la purificación de 2/6 PPV.	68
Figura 5.7. Esquema de purificación de 2/6 PPV presente en el <i>pellet</i> celular.	69
Figura 5.8. Caracterización de los túbulos de VP6.	72
Figura 5.9. Caracterización de la muestra de VP6 por HPLC-GP.	72
Figura 5.10. Desensamblaje de túbulos de VP6 (1 μ M).	73
Figura 5.11. Caracterización del producto de reacción por HPLC-GP.	74
Figura 5.12. Caracterización del producto de reacción de desensamblaje a 1 y 100 μ M de VP6 por HPLC-GP.	75
Figura 5.13. Velocidades de reacción a diferentes temperaturas del desensamblaje de túbulos de VP6.	76
Figura 5.14. Ensamblaje de VP6 a diferentes concentraciones y 27 °C.	78
Figura 5.15. Análisis del producto de reacción del ensamblaje de VP6.	79
Figura 5.16. Caracterización de la 2/6 PPV empleada en los experimentos de desensamblaje.	80
Figura 5.17. Evaluación de la agregación de la 2 PPV (1 nM) mediante anisotropía de fluorescencia.	81
Figura 5.18. Cinéticas de desensamblaje de 2/6 PPV (1 nM) a diferentes temperaturas.	82

Figura 5.19. Análisis del producto de reacción del desensamblaje de 2/6 PPV mediante HPLC-GP.	83
Figura 5.20. Cinéticas de ensamblaje de 2/6 PPV a concentración de 2 PPV de 1 nM y diferentes concentraciones de VP6 a 27°C.	85
Figura 5.21. Velocidades de ensamblaje de 2/6 a diferentes concentraciones de VP6.	86
Figura 5.22. Modelo propuesto para el ensamblaje de 2/6 PPV expresada en el sistema CI-BV.	87
Figura 5.23. Cinética de crecimiento de células TM infectadas con bacGFPVP2 a diferentes MDI.	121
Figura 5.24. Cinética de la población celular que expresó GFPVP2 a diferentes MDI de bacGFPVP2.	122
Figura 5.25. Cinética de producción GFPVP2 a diferentes MDI.	123
Figura 5.26. Cinética de producción GFPVP2 a diferentes MDI.	124
Figura 5.27. Cinética de la población celular que expresó VP6 a diferentes MDI de bacVP6.	125
Figura 5.28. Cinética de producción de VP6 a diferentes MDI.	127
Figura 5.29. Cinética de crecimiento a diferentes MDI de bacVP6 (0.1 y 1 ufp/cel) y bacGFPVP2 (0.1, 1 y 5 ufp/cel).	129
Figura 5.30. Cinética de producción de GFPVP2 a diferentes MDI de bacVP6 (0.1 y 1 ufp/cel) y bacGFPVP2 (0.1, 1 y 5 ufp/cel).	130
Figura 5.31. Cinética de producción de VP6 a MDI de bacVP6 0.1 y 1 ufp/cel a diferentes MDI de bacGFPVP2 (0.1, 1 y 5 ufp/cel).	131
Figura 5.32. Cinética de producción de 2/6 PPV a MDI de bacVP6 0.1 y 1 ufp/cel a diferentes MDI bacGFPVP2 (0.1, 1 y 5 ufp/cel).	133
Figura 5.33. Eficiencia de ensamblaje de GFPVP2 a las diferentes combinaciones de MDI utilizadas.	135
Figura 5.34. Efecto de la relación estequiometrica molar VP6/VP2 en la concentración de 2/6 PPV.	131
Figura 5.35. Relación entre la eficiencia de ensamblaje y la concentración de 2/6 PPV.	135

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Pseudo-partículas virales expresadas en diferentes sistemas.	7
Tabla 2.2. Proteínas estructurales de rotavirus.	9
Tabla 2.3. Algunas líneas celulares de insecto.	14
Tabla 4.1. Baculovirus recombinantes utilizados.	21
Tabla 5.1. Purificación de túbulos de VP6 mediante intercambio aniónico y permeación de gel.	66
Tabla 5.2. Purificación de 2/6 PPV en sobrenadante mediante intercambio aniónico y permeación de gel.	68
Tabla 5.3. Purificación de 2/6 PPV en sobrenadante mediante fases acuosas y permeación de gel.	69
Tabla 5.4. Purificación de 2/6 PPV en el <i>pellet</i> celular mediante fases acuosas y permeación de gel.	70
Tabla 5.5. Parámetros cinéticos y termodinámicos del desensamblaje de túbulos de a 1 μ M VP6.	76
Tabla 5.6. Parámetros cinéticos del ensamblaje de VP6 a 27°C.	79
Tabla 5.7. Parámetros cinéticos del desensamblaje de 2/6 PPV (1 nM).	84
Tabla 5.8. Velocidades de reacción de ensamblaje de 2/6 PPV a diferentes concentraciones de VP6 a 27°C.	86
Tabla 5.9. Combinación de MDI propuestas para la producción de 2/6 PPV.	128

INDICE DE ECUACIONES

Ecuación 2.1. Distribución de Poisson.	15
Ecuación 4.1. Normalización de la dispersión de luz.	25
Ecuación 5.1. Ecuación de decaimiento exponencial.	75
Ecuación 5.2. Ecuación de crecimiento exponencial.	78

NOMENCLATURA

2 PPV	Pseudo-partícula viral formada por VP2.
2/6 PPV	Pseudo-partícula viral formada por VP2 y VP6.
2/6/7 PPV	Pseudo-partícula viral formada por VP2, VP6 y VP7.
2/6/7/4 PPV	Pseudo-partícula viral formada por VP2, VP6, VP7 y VP4.
A	Amplitud.
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> multinuclearpoliedrovirus.
bacGFPVP2	Baculovirus que codifica para la proteína GFPVP2.
bacVP6	Baculovirus que codifica para la proteína VP6.
BSA	Albumina sérica bovina.
CI-BV	Sistema de células de insecto-baculovirus.
EGFP	Enhanced green fluorescent protein.
Emi	Emisión.
Exc	Excitación.
GFP	Green fluorescent protein.
GFPVP2	Proteína de fusión entre GFP y VP2.
GNV	Granulovirus.
hpi	Horas post-infección.
HPLC-GP	Cromatografía líquida de alta resolución de permeación en gel.
k	Velocidad de reacción.
MDI	Multiplicidad de Infección.
NPV	Nucleopoliedrovirus.
PPV	Pseudo-partículas virales.
RF	Cepa de rotavirus (mono).
Rh	Radio hidrodinámico.
SA-11	Cepa de rotavirus (bovino).
Sf21	Línea celular de <i>Spodoptera frugiperda</i> .
Sf9	Línea celular de <i>Spodoptera frugiperda</i> .
t	tiempo.
TDI	Tiempo de Infección.
Tn 5B1-4	Línea celular de <i>Trichoplusia ni</i> .

ufp	Unidades formadoras de placa.
URF	Unidades relativas de fluorescencia.
VP2	Proteína viral 2 de rotavirus.
VP4	Proteína viral 4 de rotavirus.
VP6	Proteína viral 6 de rotavirus.
VP7	Proteína viral 7 de rotavirus.
X_T	Células totales.
X_v	Células viables.
Y	Dispersión de luz.
YM	Anticuerpo policlonal de conejo anti-proteínas estructurales de rotavirus.

Letras Griegas

α	Fase temprana inmediata o constante de proporcionalidad.
β	Fase temprana.
γ	Fase tardía.
δ	Fase muy tardía.
μ	Velocidad específica de crecimiento.

RESUMEN

Las pseudo-partículas virales (PPV) son de interés en diversos campos como la vacunación, la terapia génica y la nanotecnología. Con el interés de obtener procesos de producción a nivel piloto e industrial de PPV, este proyecto se enfocó en el desarrollo de estrategias de producción de la 2/6 PPV de rotavirus (formada por VP2 y VP6) en el sistema de células de insecto-baculovirus (CI-BV). Este estudio se desarrolló mediante diversos enfoques como: el estudio *in vivo* de la localización celular de la 2/6 PPV y las proteínas estructurales; el estudio *in vitro* del ensamblaje y desensamblaje de la 2/6 PPV y los túbulos de VP6; la caracterización y cuantificación de PPV de rotavirus mediante cromatografía líquida (HPLC); la purificación de la 2/6 PPV y túbulos de VP6 mediante HPLC y sistemas de fases acuosas; el estudio de la dinámica poblacional de las células que expresaron la 2/6 PPV mediante citometría de flujo, y por último el estudio de diversas estrategias de coinfección para la producción de 2/6 PPV. De estos diversos enfoques se determinó que el ensamblaje de la 2/6 PPV ocurre intracelularmente y que las estrategias de coinfección deberán satisfacer la condición de que cada célula coexpresara ambas proteínas (VP2 y VP6). Mediante el análisis del desensamblaje y ensamblaje *in vitro* se logró determinar que la formación de las 2/6 PPV se ve favorecida cinéticamente sobre la formación de los túbulos de VP6 cuando ambas proteínas son coexpresadas. Mediante el estudio de citometría de flujo se logró identificar las condiciones que resultaron en la coexpresión de ambas proteínas en al menos el 50% de las células. Con estas estrategias de coinfección, al analizar la producción y la eficiencia de ensamblaje de la 2/6 PPV, se determinó que la mejor estrategia de producción de 2/6 PPV es la coinfección a multiplicidades de infección iguales (0.1 ó 1 ufp/cel) de cada baculovirus que expresa VP2 y VP6. La relevancia científica de este proyecto es que es el primero en analizar el ensamblaje *in vivo* e *in vitro* de la 2/6 PPV y proponer un modelo de ensamblaje. Además, es el primer estudio en desarrollar un proceso integral (producción, ensamblaje y purificación) para la producción de PPV, enfoque que puede ser empleado en la producción de PPV de otros virus.

ABSTRACT

Virus-like particles (VLPs) are of interest in several fields as vaccination, gene therapy and nanotechnology. The aim of this project was to develop rational strategies for double-layered rotavirus-like particle (dRLP) production in the baculovirus expression vector system (BEVS). This study was performed utilizing various approaches, such as: *in vivo* analysis of the cellular localization of structural proteins (VP2 and VP6) and dRLP; *in vitro* assembly and disassembly of dRLP and VP6 tubules, characterization of dRLP and VP6 tubules, quantification and purification by gel permeation chromatography and aqueous two phase systems; analysis of the population kinetics during co-infection of insect cells with two different recombinant baculoviruses for dRLP production by flow cytometry; and, finally, the evaluation of dRLP concentration and assembly efficiency using different co-infection strategies for dRLP production. These studies showed that dRLP assembly occurs intracellularly, and that co-infection strategies must assure that every cell expresses both recombinant proteins (VP2 and VP6). *In vitro* assembly and disassembly kinetics suggest that VP6 assembly in dRLP is favored over its assembly in tubules, due to the higher assembly rate of dRLP. By flow cytometry analysis of the cells populations, it was possible to find co-infection strategies that resulted in at least 50% of the population expressing both proteins. When the dRLP concentration and assembly efficiencies were analyzed, the best performance was achieved when using the same multiplicity of infection of the two baculoviruses (0.1 or 1 pfu/cell) that express VP2 and VP6. The scientific relevance of this study is that, for the first time, dRLP and VP6 tubules assembly was analyzed *in vitro* and, that with these results, a dRLP assembly model was proposed. In addition, this study is the first that develops an integral process (production, assembly and purification) for dRLP production, which can be extrapolated to other VLPs.

1. INTRODUCCION

Las pseudo-partículas virales (PPV) son de interés para diversos campos, como la vacunación y la terapia génica, incluyendo también la nanotecnología. En la vacunación su auge es debido a que su estructura es idéntica a la del virus nativo, pero carecen de material genético, por lo tanto no son infectivas y otorgan inmunidad igual o mejor que los virus atenuados o inactivados. Actualmente existen varias vacunas basadas en PPV, entre ellas está Gardasil™, la vacuna para papilomavirus humano desarrollada por Merck (Siddiqui y Perry., 2006).

La producción de PPV recombinantes se puede hacer en diferentes sistemas de expresión como bacterias, levaduras, células de insecto o células de mamífero, pero es el sistema de células de insecto-baculovirus (CI-BV), el más difundido y versátil. El sistema de CI-BV consiste en utilizar un baculovirus recombinante (vector), que codifica para una o varias de las proteínas estructurales, para infectar células de insecto (huésped). Su versatilidad es debido a que pueden ser usados el mismo número de baculovirus que de proteínas a expresar, o bien emplear un solo baculovirus que incluya todas las proteínas. Además, el nivel de expresión de las proteínas es manipulable principalmente mediante la multiplicidad de infección.

La producción comercial de PPV requiere tener procesos de producción a nivel piloto e industrial que satisfagan la demanda de PPV, tanto para estudios clínicos, en vacunación como terapia génica. La producción de PPV a nivel piloto y más aun industrial, no es una operación sencilla, especialmente cuando la PPV está formada por varias capas proteicas, debido que diferentes aspectos como la eficiencia de ensamblaje, la concentración de proteínas estructurales, entre otros, afectan directamente el rendimiento de producción de PPV. Por lo tanto, el objetivo de este proyecto fue estudiar el proceso de producción de las PPV de rotavirus desde diferentes enfoques, como el estudio *in vivo* de la localización de las proteínas estructurales de rotavirus en las células de insectos, el desarrollo de metodologías de cuantificación y purificación de PPV, estudio del ensamblaje de las PPV *in vitro* para la determinación del proceso de ensamblaje y del paso limitante en el proceso de producción, y por último,

estudio de la dinámica poblacional de las células de insecto en estrategias de coinfección. Los resultados obtenidos de todos estos enfoques fueron integrados finalmente para proponer varias estrategias de producción de PPV de rotavirus. Estrategias que fueron evaluadas en la eficiencia de ensamblaje y concentración de PPV obtenida con el interés de obtener un proceso que maximice la producción de PPV de rotavirus.

2. ANTECEDENTES

2.1. Pseudo-partículas virales (PPV)

Las PPV son estructuras similares a los virus nativos pero carecen de material genético. Estas estructuras pueden estar conformadas por una misma proteína estructural o por más de una proteína. Además, pueden consistir en una sola capa proteica o múltiples capas proteicas. La posibilidad de obtener PPV de forma recombinante es debido a que las proteínas estructurales de algunos virus, dadas las condiciones necesarias (concentración, pH, fuerza iónica, etc.) pueden autoensamblarse tanto *in vivo* como *in vitro* (Ciarlet *et al.*, 1998; Goldman *et al.*, 1999; Fromantin *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2002). Debido a que las PPV carecen de material genético éstas no son infectivas. Por lo tanto pueden ser empleadas como vacunas seguras, como el caso de la vacuna para Hepatitis B, o también, la vacuna para papilomavirus humano (GARDASIL™) (Thomas y Carman, 2000; Siddiqui y Perry, 2006). Además, las PPV tienen utilidad en otros campos como la terapia génica y la nanotecnología. Actualmente se estudia la posibilidad de emplear PPV de virus adeno-asociado producidas en células de insecto como vectores para terapia génica, debido a la capacidad de empaquetar material genético foraneo (Urabe *et al.*, 2002). Mientras que en la nanotecnología, las PPV pueden ser usadas como templados para la formación de nanomateriales o nanoestructuras (Fischlechner y Donath, 2007).

2.1.1. Ensamblaje de las PPV

El ensamblaje del virus es un paso fundamental en el proceso de replicación viral, debido a que la cápside protege, transporta y en algunos casos, transcribe el material genético que contiene en su interior (Pesavento *et al.*, 2001; Zandi *et al.*, 2006). En el caso de las PPV, el ensamblaje es de interés debido a que la

respuesta inmunológica es dependiente de la estructura de la PPV, la que debe ser similar al virus nativo (Tleugabulova *et al.*, 1999).

Las cápsides virales y las PPV se ensamblan bajo ciertas condiciones que propician la interacción entre las proteínas y mantienen estas interacciones estables. Estas interacciones son las fuerzas de Van der Waals, las interacciones hidrofóbicas, los puentes de hidrógeno y los puentes de disulfuro. Además estas interacciones son dependientes de parámetros como temperatura, concentración de proteína, pH, potencial redox y fuerza iónica (Ishizu *et al.*, 2001; McCarthy *et al.*, 1998). El ensamblaje de las cápsides virales puede ser analizado como una reacción de polimerización donde la fuerza que dirige el proceso es la interacción hidrofóbica entre las zonas apolares de las subunidades proteicas. Sin embargo esto no ocurre como un reacción en un sólo paso, sino que sigue una cascada de reacciones en serie de bajo orden de reacción (Ceres *et al.*, 2002; Zandi *et al.*, 2006). Aunque existen diversos estudios sobre dinámica molecular de ensamblaje de cápsides virales icosaedricas, la mayoría de estos ensamblajes están enmarcados en el modelo de equilibrio (Endres y Zlotnick, 2002). El modelo de equilibrio (EQ) describe el ensamblaje como una reacción en equilibrio entre las subunidades estructurales (monómeros, dímeros o pentámeros) y las cápsides virales, pasando por unos estados intermediarios que se encuentran en baja concentración. En este modelo la energía de interacción entre las proteínas es dependiente de las condiciones medioambientales. Si esta energía es baja, puede presentarse una fase *lag* antes de iniciarse la formación de la cápside viral. Esta fase es conocida como nucleación, en la cual es necesario alcanzar determinada concentración de intermediarios para desencadenar el ensamblaje de la cápside (Zandi *et al.*, 2006). Pero si la energía de interacción es muy alta, el ensamblaje de las cápsides puede caer en estados pseudo-estables, en los cuales no se ha terminado de ensamblar la cápside. Estos estados son conocidos como trampas cinéticas y se caracterizan por un rápido agotamiento de las subunidades hacia intermediarios incompletos (Zlotnick *et al.*, 1999). El conocimiento del proceso de ensamblaje de las PPV puede ser muy útil en el desarrollo de estrategias racionales de producción de PPV, puesto que el objetivo es maximizar el

ensamblaje de las proteínas estructurales.

2.1.2 Expresión recombinante PPV

Es posible producir las PPV en diferentes sistemas recombinantes como bacterias, levaduras, células de mamífero, células de insecto, plantas y larvas de insecto (Ver **Tabla 2.1**).

Tabla 2.1. Pseudo-partículas virales expresadas en diferentes sistemas.

Sistema de expresión^a	PPV
Bacteria (<i>E. coli</i>)	Hepatitis B y C
Levaduras	Herpes simplex, Poliomavirus, Papilomavirus
CI-BV	Papilomavirus, Rotavirus, HIV, Parvovirus, Hepatitis C, Herpes simplex, Poliomavirus, Adeno-Asociado
Plantas (Tomate, tabaco, papa)	Rotavirus, Hepatitis B, Norwalk, Papilomavirus
Larvas	Virus de necrosis pancreática

^a. Referencias: Takehara *et al.*, 1988; Rose *et al.*, 1993; Tsao *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1997; Roy *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1998; Tlegabulova *et al.*, 1998; Palkova *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 2001; Hu y Bentley, 2001; Palomares *et al.*, 2002; Noad y Roy, 2003; Warzwcha *et al.*, 2003; Saldaña *et al.*, 2006.

El sistema de expresión recombinante es escogido según las necesidades. Por ejemplo, si el interés es producir altas concentraciones de una proteína estructural sin importar el ensamblaje, el sistema a escoger es *E. coli*. Pero si el objetivo es obtener cápsides virales correctamente ensambladas formadas por una sola proteína, el sistema más apropiado son las levaduras (Zhang *et al.* 1998). También en el interés de tener un sistema de fácil administración de las PPV como vacunas, se ha estudiado la producción de PPV en productos naturales como tomates y papas (Warzecha *et al.*, 2003; Saldaña *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2006).

Pero indiscutiblemente el sistema más utilizado para la producción de PPV es el sistema de CI-BV. La ventaja que presenta este sistema es la versatilidad para producir PPV con estructuras más complejas formadas por más de una clase de proteína, debido a que en él es posible expresar fácilmente 4 ó 5 proteínas estructurales de una cápside y además el nivel de expresión es fácilmente manipulable (Palomares *et al.* 2002).

2.1.3. Rotavirus. Estructura y morfología.

El estudio de la producción de PPV de rotavirus como posibles vacunas es de interés, ya que los rotavirus representan un problema de salud pública al ser causantes de diarrea en infantes. La infección por rotavirus produce gastroenteritis aguda, daño en la mucosa intestinal y deshidratación. (O'Neal *et al.*, 1997; Conner *et al.*, 1997).

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae*. Son virus de ARN de doble cadena (11 segmentos, para un total de 18.5 kpb). El ARN y 2 proteínas estructurales (VP1 y VP3), están confinados en el interior de una estructura conformada por multímeros de 4 proteínas estructurales (Estes y Cohen, 1989; Kipikian y Chanock, 1996; Mathieu *et al.*, 2001) **Figura 2.1 y Tabla 2.2.**

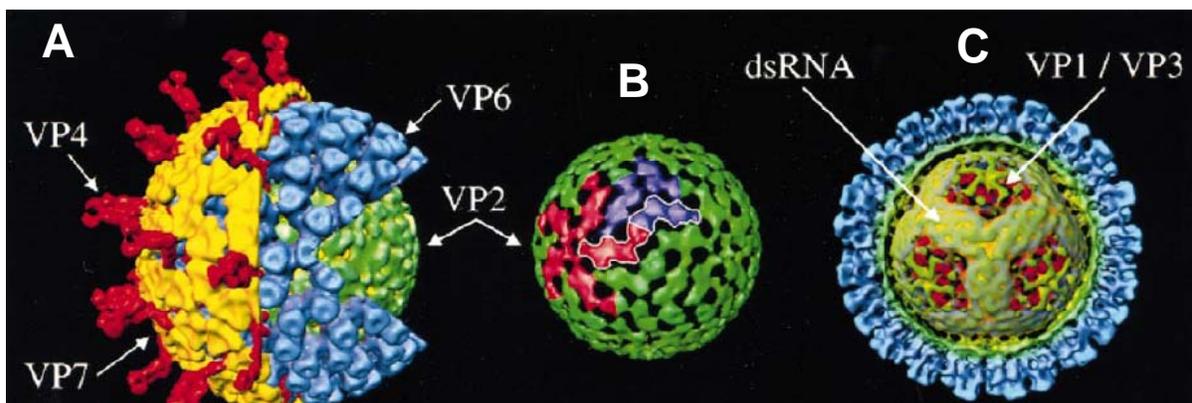


Figura 2.1. Estructura de rotavirus. **A.** Partícula completa de 70 nm de diámetro. **B.** Nucleocápside formada por 120 monómeros de VP2 (50 nm de diámetro). **C.** Ordenamiento del ARN de doble cadena al interior de la partícula. Figura tomada de Patton y Spencer (2000). Reconstrucción por computadora de criomicroscopía electrónica.

La nucleocápside está conformada por la proteína estructural VP2 (VP1 y VP3 están al interior de la nucleocápside). La formación de la nucleocápside se da por interacción de 120 unidades de VP2. Esta nucleocápside tiene un diámetro de 50 nm. Si se expresa VP2 de forma recombinante en células de insecto, esta proteína tiene la capacidad de autoensamblarse. La formación de la nucleocápside es necesaria para la continuación del ensamblaje de la PPV completa (Prasad *et al.*, 1988; Estes y Cohen, 1989; Labbé *et al.*, 1991; Zeng *et al.*, 1998). Estudios de criomicroscopía han demostrado que VP2 se organiza en dímeros. Estos dímeros interactúan para formar un decámero, y doce de estos decámeros forman la nucleocápside (Lawton *et al.*, 1997).

Tabla 2.2. Proteínas estructurales de rotavirus^a

Proteína	PM (kDa)	# de moléculas / virión	% Proteína total
VP2	102.5	120	15
VP6	44	780 (260 trímeros)	51
VP7	33	780	30
VP4	86	120 (60 dímeros)	1.5

^a Adaptada de Kipikian y Chanock (1996).

La siguiente capa está conformada por 260 subunidades de VP6. Estas subunidades son trímeros de VP6, para un total de 780 moléculas. Para el correcto ensamblaje de VP6 es necesario que la capa interna de VP2 ya esté conformada, debido a que VP6 en ausencia de VP2 presenta polimorfismo estructural dependiendo del pH y fuerza iónica (trímeros, esferas, túbulos y pequeños agregados). La estructura de doble capa formada por las proteínas VP2 y VP6 tiene un diámetro de 70 nm (Charpilienne *et al.*, 2001; Gilbert *et al.*, 2001; Lepault *et al.*, 2001; Mathieu *et al.*, 2001).

La tercera capa de rotavirus está conformada por la proteína glicosilada VP7 y 60 espículas de VP4. La expresión recombinante de estas proteínas puede originar una variedad de estructuras: la cápside formada por la proteína VP2 (2 PPV), la formada por VP2 y VP6 (2/6 PPV), por VP2, VP6 y VP7 (2/6/7 PPV) y la estructura formada por las 4 proteínas (2/6/7/4 PPV) (Palomares *et al.*, 2002).

La infección por rotavirus empieza con la interacción de VP7 y VP4 con varios receptores en la membrana celular. Posteriormente, al entrar el virus a la célula, pierde la capa formada por VP7 y VP4, debido a la baja concentración de calcio al interior de la célula. Una vez que la cápside 2/6 PPV está en el interior de la célula (citoplasma), se liberan los transcritos que codifican para las proteínas estructurales y no estructurales.

La síntesis de VP1, VP2, VP3, VP6 y otras proteínas no estructurales se hace por ribosomas libres en el citoplasma y estas proteínas se encuentran concentradas en viroplasmos donde se ensamblan las proteínas VP2, VP6 y se empaqueta el material genético. La síntesis de la proteína VP7, se hace en ribosomas asociados al retículo endoplasmático (RE). El ensamblaje de VP7 y VP4 a la cápside no está del todo esclarecido. Algunos autores indican que primero se asocia la partícula 2/6 PPV con la proteína VP4 y que posteriormente en el RE madura el virus con la adición de VP7 (Estes, 1996; Patton *et al.*, 2000).

Diferentes autores han reportado la utilidad de las PPV de rotavirus como vacuna en estudios desarrollados en animales (Shuttleworth *et al.*, 2005). Bertolotti-Ciarlet *et al.* (2003) reportaron protección de 89% en ratones (94 individuos) inoculados con la 2/6 PPV que fueron posteriormente retados con virus nativo. También, O'Neal *et al.*, (1997) reportaron 100% de protección en ratones inoculados con la 2/6/7 PPV, mientras que la protección con la 2/6 PPV fue del 92% (administración intranasal).

2.2. Sistema Células de Insecto-Baculovirus (CI-BV).

El sistema CI-BV consiste en un vector (baculovirus) que contiene los genes de interés. Al infectar células de insecto (huésped) se expresan las proteínas recombinantes. La expresión de los genes recombinantes se hace bajo los promotores *polh* o *p10*. Se utiliza especialmente el promotor *polh*, debido a que es un promotor muy fuerte. En la infección de células de insecto por baculovirus nativo, la proteína expresada bajo este promotor (poliédrica) llega a ser

aproximadamente del 30-50% del contenido total de proteína celular. Por lo tanto, en los baculovirus recombinantes se ha reemplazado el gen de la poliédrica, por el gen de la proteína que se desea expresar (Palomares *et al.*, 2006).

2.2.1. *Baculovirus*

La familia de virus *Baculoviridae* es la más conocida entre los virus de insecto. Son virus de doble cadena circular de ADN embebidos en una cápside proteica. La familia *Baculoviridae* esta subdividida en *baculovirinae* y *nudibaculovirinae*, que indica la presencia o ausencia de formas ocluidas, respectivamente. La subfamilia *baculovirinae* se subdivide en nucleopoliedrovirus (NPV, varios viriones por cuerpo ocluido) y granulovirus (GNV, un solo virión por cuerpo ocluido) (Gruenwald y Heitz, 1993; Miller, 1996; Palomares *et al.*, 2006).

El baculovirus consiste en una estructura de 40-50 nm de diámetro y 200-400 nm de largo (**Figura 2.2**). Su genoma es aproximadamente de 80-230 kpb. La matriz poliédrica donde están embebidos los viriones está formada por la proteína poliédrica (29 kDa). Mediante manipulación genética se han modificado varios baculovirus para la expresión de proteínas recombinantes, reemplazando el gen de *polh* por el gen deseado. El baculovirus más utilizado en el sistema CI-BV es el virus de multinuclearpoliedrosis de *Autographa californica* (AcMNPV). Su ciclo de replicación incluye virus que geman de las células, y los virus ocluidos, que solo pueden infectar otras células cuando son liberados de la matriz de poliedrica.

El ciclo de infección del baculovirus está dividido en 4 etapas: fase temprana inmediata (α), fase temprana (β), fase tardía (γ) y fase muy tardía (δ). En la fase α se lleva a cabo la migración de los viriones al núcleo de la célula e inicio de la transcripción. En la fase temprana (4-7 h.p.i.), el baculovirus empieza a controlar los procesos de replicación celular, dirigiéndolos hacia los procesos de transcripción, traducción y replicación del virus. En la fase tardía (7-20 h.p.i.), se lleva a cabo la replicación viral y también se producen los virus no ocluidos (sin capa de poliédrica) que son liberados para infectar otras células (infección secundaria). Finalmente la fase muy tardía (20-24 h.p.i.) es la de mayor interés del

sistema CI-BV, ya que en esta fase se expresan los genes (*polh* y *p10*), también conocidos como genes hiperexpresados. Estas proteínas no son esenciales para la replicación *in vitro* del baculovirus (Smith *et al.*, 1983; O'Reilly *et al.*, 1994; Miller, 1996; Palomares *et al.*, 2006) (**Figura 2.3**).

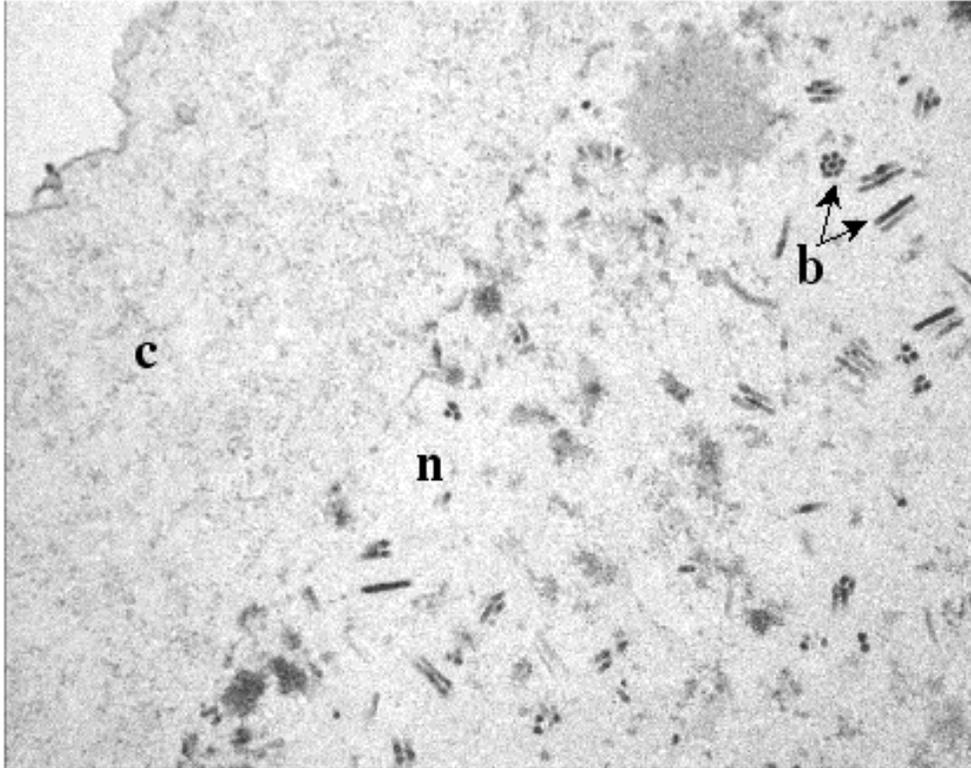


Figura 2.2. Célula de insecto infectada con baculovirus a 48 horas-post infección. Baculovirus (b), núcleo celular (n) y citoplasma (c). Foto tomada por Jimmy A. Mena.

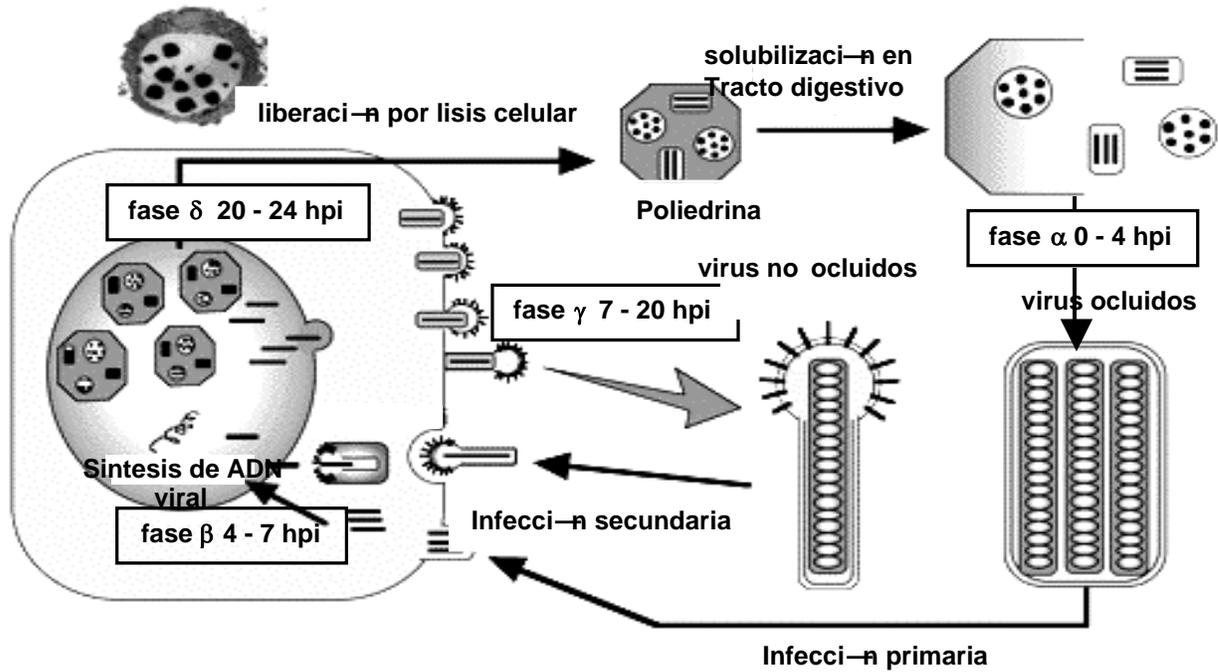


Figura 2.3. Ciclo de replicación de baculovirus en la larva de lepidóptero. Diseño Adrián Delgado.

El sistema CI-BV es versátil y de alta productividad debido a ventajas tanto del baculovirus como de las células de insecto. Entre las ventajas del sistema dadas por el baculovirus están:

- Altos niveles de expresión de los genes expresados bajo promotores *polh* y *p10*. Existen reportes de rendimientos de hasta 1g de proteína por 10^9 células (Gruenwald y Heitz, 1993).
- Capacidad de inserciones de genes relativamente grandes debido a la flexibilidad de la cápside viral. Además es posible expresar hasta cuatro genes en un sólo baculovirus bajo el mismo promotor (Gruenwald y Heitz, 1993).

2.2.2. Células de insecto

Actualmente existen diversas líneas celulares de insecto que pueden ser empleadas según los objetivos deseados (**Tabla 2.3**). Entre las líneas celulares más empleadas para expresión recombinante están Sf9, Sf21 (*Spodoptera frugiperda*), Tn 5B1-4 disponible comercialmente con el nombre High Five™, Tn-4h (*Trichoplusia ni*) (Palomares *et al.*, 2006).

Tabla 2.3. Algunas líneas celulares de insecto^a

Línea celular	Origen celular
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Embrión
<i>Limantria dispar</i>	Hemocitos
<i>Mamestra brassicae</i>	Larva neonato
<i>Manduca sexta</i>	Ovario de pupa
<i>Trichoplusia ni</i>	Ovario adulto
<i>Spodoptera exigua</i>	Ovario de pupa
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Ovario adulto

^a Adaptada de Palomares *et al.* (2006).

La expresión de proteínas recombinantes en células de insecto tiene varias ventajas como:

- Un ambiente eucariótico para la producción de proteínas recombinantes, lo que ayuda a su plegamiento y evita la formación de cuerpos de inclusión, induce la correcta formación de enlaces disulfuro, procesamiento postraduccional como N-glicosilación, fosforilación, acilación, amidación y carboximetilación, en algunos casos idénticas o similares al procesamiento hecho en células de mamíferos (O'Reilly *et al.*, 1994).
- Altos niveles de expresión de proteína recombinante en comparación con los sistemas de células de mamíferos (Palomares *et al.*, 2006).

2.2.3. Parámetros del sistema CI-BV. Multiplicidad de infección, Tiempo de infección.

Los parámetros más importantes en el sistema CI-BV son la multiplicidad de infección y el tiempo de infección, además de otros como fase de crecimiento, edad del cultivo, tiempo de cosecha y composición del medio. (Power *et al.*, 1994; Rhiel *et al.*, 1997; Hu y Bentley, 2001).

La multiplicidad de infección (MDI) se define como el número de partículas infectivas que son adicionadas por célula en el cultivo. Una MDI de 1 ufp/célula significa que por cada célula de insecto en el cultivo se ha adicionado una partícula infecciosa de baculovirus. En cambio, una MDI de 20 ufp/célula significa que se han adicionado 20 partículas infectivas por cada célula de insecto. Pero cabe resaltar que el número de partículas que infecta una célula está determinado por una distribución probabilística. Esta distribución probabilística puede ser descrita por la ecuación de Poisson (**Figura 2.4** y **Ecuación 2.1**).

$$P = (MDI^r e^{-MDI})/r! \quad \text{Ecuación 2.1. Distribución de Poisson}$$

Donde P es la probabilidad que una célula esté infectada por r partículas infecciosas. Es de resaltar que algunos autores (Licari y Bailey, 1991; Dee and Shuler, 1997) han determinado que la distribución de Poisson no define estrictamente el comportamiento del cultivo infectado y que es necesario ajustar esta distribución mediante un factor α (constante de proporcionalidad o infectividad) que depende de la modalidad de cultivo. Este factor puede ser 0.04 para cultivos estáticos y 0.08 para cultivos suspendidos.

La MDI es uno de los parámetros más determinantes en el sistema de CI-BV. Mediante la MDI es posible manipular la velocidad específica de producción de proteína y también la concentración máxima de proteína. Esto se debe a que al incrementar la MDI, aumenta la probabilidad de que una célula sea infectada por más de un baculovirus, y por ende aumenta el número de copias del gen de interés que será expresado en la célula. Esta manipulación depende de la etapa

del cultivo y la línea celular. En cultivos en inicio de la fase exponencial, incrementar la MDI no significa un aumento en la concentración de proteína. En contraste, si la infección se hace a la mitad de la fase exponencial de crecimiento, un aumento en la MDI se refleja en un incremento de la concentración de proteína (Licari y Bailey, 1991; Tsao *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1996; Palomares, 1999).

En lo referente a la velocidad de producción, Palomares *et al.* (2002) reportó que un incremento de 1 a 10 ufp/célula en la MDI repercute en un aumento en la velocidad específica de producción de VP2 de 0.2 a 0.8 UA/mL*h. Estos experimentos fueron hechos con células Sf9. Mena (2004) reportó un incremento en la máxima velocidad específica de producción de GFPVP2 de 2.5 veces más al aumentar la MDI de 1 ufp/célula a 20 ufp/célula, aunque la concentración máxima de proteína alcanzada fue similar a ambas MDI.

Otro parámetro determinante en el sistema de células de insecto es el tiempo de infección (TDI). El tiempo de infección se define como la concentración celular al momento de infectar el cultivo. El tiempo de infección está intrínsecamente relacionado con la edad del cultivo (fase exponencial o estacionaria) y con la concentración de nutrientes, ya que al momento de la infección debe haber una alta actividad celular (fase de crecimiento exponencial) para soportar la infección viral y producción de proteína. Además deben existir los nutrimentos necesarios para obtener los niveles de expresión deseados.

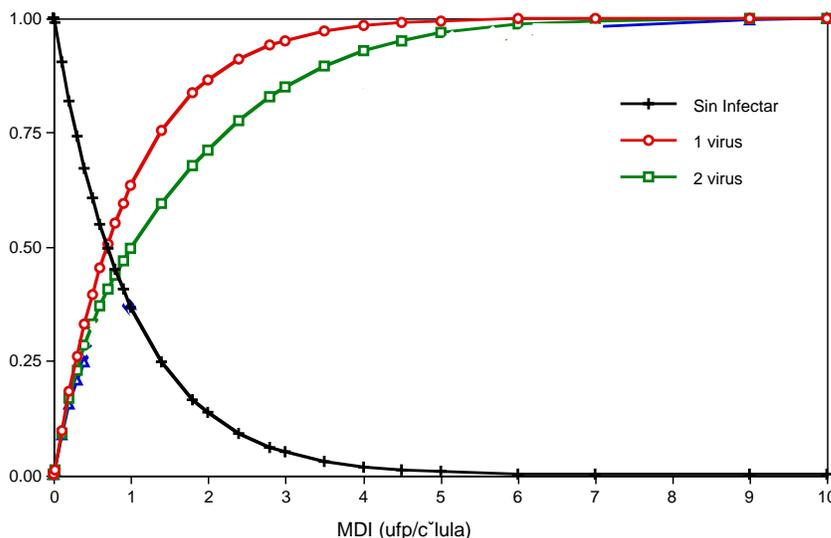


Figura 2.4. Distribución de Poisson. Probabilidad de que las células sean infectadas por n partículas virales dependiendo de la MDI.
2.2.4. Expresión de PPV en el sistema CI-BV

Para la producción de PPV en el sistema de CI-BV existen varias alternativas dependientes del producto deseado. Si la cápside viral es monoprotéica, solamente es necesario un baculovirus y puede manipularse la MDI y/o el TDI para obtener el mayor rendimiento posible. Pero si la cápside viral es multiprotéica (formada por más de una clase de proteína) y de estequiometría definida, es posible usar un baculovirus para expresar cada proteína o un solo baculovirus que codifique para todas las proteínas estructurales (Tsao *et al.*, 1996; Hu y Bentley, 2001; Palomares *et al.*, 2002).

Vieira *et al.* (2005) compararon la estrategia de producción de PPV de un solo baculovirus para expresar las proteínas estructurales VP2, VP6 y VP7 de rotavirus (estrategia multicistrónica) con la infección con un baculovirus para cada proteína (estrategia de coinfección). Desde el punto de vista de producción de PPV, se observó que la estrategia multicistrónica produjo 64% más que la estrategia de coinfección, aunque es de resaltar que la técnica de cuantificación de 2/6/7 PPV utilizada en este estudio fue ambigua, poco exacta e indirecta. Sin embargo, en ambas estrategias se alcanzaron niveles de ARN mensajero similares (1×10^{11} copias/mL) y la vida media de estos fue similar también (4.4 h aproximadamente), lo que sugeriría niveles de expresión similares de las proteínas estructurales en ambas estrategias y por lo tanto similares concentraciones de PPV. Una gran ventaja de la metodología multicistrónica es la utilización de un solo baculovirus y también que se asegura que cada célula está expresando todas las proteínas estructurales. Pero una desventaja es que no es posible manipular la concentración de las proteínas estructurales, a través de la MDI, para de esta forma maximizar el ensamblaje.

En contraste, la estrategia de coinfección con varios baculovirus, permite modular la expresión de las proteínas estructurales. Palomares *et al.* (2002) estudió la producción de 2/6 PPV en células Sf9 usando la estrategia de coinfección. Cuando realizaron la infección a MDI de 1 ufp/célula de cada baculovirus, la concentración de VP6 fue 13 veces mayor que VP2, mientras que la relación estequiométrica teórica entre VP2 y VP6 en la PPV es de 2.84 (gr VP6/gr VP2). Pero cambiando la relación entre MDI de baculovirus (MDI bacVP2/MDI bacVP6) entre 1.5 y 5

ufp/cel se obtuvo una relación de concentraciones VP6/VP2 cercana a la estequiométrica. También Tsao *et al.* (1996) emplearon la estrategia de coinfección para la producción de PPV de parvovirus B19. Ellos manipularon las MDI y la relación de MDI de dos baculovirus (bacVP1 y bacVP2) para optimizar la composición y la producción de la cápside, debido a que a mayor proporción de VP1, mayor respuesta inmunológica. Mediante esta estrategia de coinfección lograron incrementar la proporción de VP1 en la cápside de 5% (estrategia multicistrónica) a 50%.

Analizando la utilidad de las PPV como vacunas, las ventajas del sistema de CI-BV para expresar cápsides virales, la complejidad del proceso ensamblaje y producción de cápsides multiproteicas en este estudio se plantea el desarrollo de estrategias racionales de producción de PPV a partir del conocimiento del ensamblaje *in vivo* e *in vitro*, de la dinámica de la población coinfectada durante la producción de PPV, de la manipulación de las concentraciones de las proteínas estructurales para aumentar la eficiencia de ensamblaje y por ende la producción de 2/6 PPV. Además, en el interés de tener un proceso de producción integro también se estudiará el desarrollo de metodologías de purificación analítica y preparativa de PPV con el interés de obtener un proceso de purificación de PPV fácilmente escalable. Inicialmente este estudio se realizará con la 2/6 PPV, y estos resultados servirán para extrapolarlos a la producción de otras cápsides virales.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo General

- Desarrollar estrategias de producción de PPV, a través de la manipulación de la MDI de dos baculovirus (bacGFPVP2 y bacVP6), para obtener el mayor rendimiento posible de PPV correctamente ensambladas y extrapolar este conocimiento a la producción de PPV de otros virus con cápsides multiproteicas.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar la localización celular de las proteínas GFPVP2, VP6 y de la 2/6 PPV cuando son expresadas en células de insecto.
- Desarrollar un método analítico para la cuantificación de las PPV en muestras de cultivo celular y muestras del proceso de purificación.
- Desarrollar un proceso de purificación de la 2/6 PPV y de los túbulos de VP6 que pueda ser integrado en un proceso de producción PPV a nivel de planta piloto.
- Determinar *in vitro* las velocidades de reacción del desensamblaje y ensamblaje de los túbulos de VP6.
- Determinar *in vitro* las velocidades de reacción del desensamblaje y ensamblaje de la 2/6 PPV.
- Plantear un modelo de ensamblaje (*in vitro*) de la 2/6 PPV y los túbulos de VP6 a partir de los datos físico-químicos y termodinámicos.

- Determinar la dinámica poblacional de las células infectadas con los baculovirus (bacGFPVP2 y bacVP6) a diferentes MDI y relaciones de MDI.
- Estudiar la cinética de producción de 2/6 PPV a diferentes MDI y relaciones de MDI de los baculovirus (bacGFPVP2 y bacVP6).
- Determinar la relación de MDI (bac GFPVP2/bac VP6) que optimiza la producción y ensamblaje de la 2/6 PPV en el sistema CI-BV.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Línea celular

Se utilizó la línea celular BTI-Tn-5B1-4 (Invitrogen, USA) más conocida como High Five™. Esta línea proviene del ovario del lepidóptero *Trichoplusia ni*. Todos los cultivos se realizaron con células del mismo lote celular mantenido en nitrógeno líquido. En los experimentos de cinéticas de producción, localización celular y purificación preparativa se trabajó con células entre los pases 45 y 60, para evitar el efecto del pase en los resultados. Para el título del *stock* viral se utilizó la línea celular Sf9 (ATCC CRL-1711) de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda*.

4.2. Baculovirus recombinantes

Los baculovirus recombinantes utilizados durante este estudio se listan en la **Tabla 4.1**. El baculovirus bacVP6 fue donado por la Dra. Susana López (IBT-UNAM) y el bacGFPVP2 fue donado por el Dr. Jean Cohen (INRA-Francia). El título viral fue calculado según el método descrito en Mena *et al.* (2003).

Tabla 4.1. Baculovirus recombinantes utilizados

Baculovirus	Proteína	Cepa	Promotor	Referencia
bacGFPVP2	GFPVP2* (120 KDa)	RF	Poliedrina	Charpillienne et al., 2001
bacVP6	VP6 (44 KDa)	SA-11	Poliedrina	Crawford et al., 1994

* El baculovirus bacGFPVP2 codifica para la proteína de fusión GFP-VP2, que es una quimera compuesta por la proteína VP2 y la proteína EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein). Se referenciará la proteína EGFP como GFP.

4.3. Cultivos de células en suspensión

Los cultivos se realizaron en matraces de 250 mL con 60 mL de medio de cultivo SF900II (Invitrogen, USA), agitados a 110 rpm y mantenidos a 27 °C. Células High Five™, con viabilidad superior a 95% y en fase exponencial, se sembraron a una densidad celular de $0.5 \cdot 10^6$ células/mL y fueron infectadas en ese mismo instante. Todos los ensayos se realizaron por duplicado, incluyendo los matraces control (sin infectar). Se tomaron muestras cada 24 horas post-infección (hpi) para medir concentración celular, viabilidad, concentración de GFPVP2, VP6 y pseudo-partículas virales.

4.4. Métodos analíticos

4.4.1. Determinación de concentración y viabilidad celular

La concentración celular se determinó mediante un contador electrónico de partículas con tubo de apertura de $100\mu\text{m}$ (Coulter Multisizer II, Coulter Electronics Inc. USA). Para diluir la muestra se utilizó la solución isotónica recomendada por el fabricante del equipo. La viabilidad celular se determinó con la técnica de exclusión de azul de tripano en un hematocitómetro.

4.4.2. Cuantificación de VP6 y GFPVP2

La cuantificación de GFPVP2 *in vivo* se realizó mediante un ensayo espectrofluorométrico desarrollado por Mena (2004), usando un espectrofluorímetro LS-55 y el software FL-Winlab (Perkin-Elmer, U.K.). Una descripción breve del método es: Cuantificar por Coulter Multisizer II la concentración celular de la muestra a analizar y de un control (células sin infectar). Tomar el volumen necesario para obtener 500,000 células, tanto de la muestra como del control. Centrifugar la muestra y el control a 14,000 rpm durante 10 min.

Remover el sobrenadante. Adicionar 1.5 mL de *buffer* Tris-EDTA (10 mM, 0.1 mM, pH 8.0) y agitar hasta homogenizar. Centrifugar la muestra y el control a 14,000 rpm durante 10 min. Remover el sobrenadante. Adicionar 0.5 mL de *buffer* Tris-EDTA y agitar hasta homogenizar. Tomar 75 μ L de la muestra y mezclarlos en la cubeta de cuarzo con 75 μ L de *buffer* Tris-EDTA. Leer la fluorescencia en URF (unidades relativas de fluorescencia) a 510 nm excitando a 484 nm. La apertura del monocromador de la lámpara debe ser 2.5 nm y la apertura del fotomultiplicador 20 nm.

La proteína VP6 se cuantificó mediante ELISA utilizando el kit IDEIA™ Rotavirus (DakoCytomation, U.K.) y como estándar se utilizó VP6 producida durante este estudio.

4.4.3. Cuantificación de pseudo-partículas virales

La caracterización y cuantificación de 2/6 PPV fue analizada según el método desarrollado en este trabajo y descrito en la **Sección 5.2** (Mena *et al.*, 2005)

4.4.4. Geles de poliacrilamida y Western blotting

La separación de las proteínas mediante geles desnaturizantes de poliacrilamida se realizó con un gel concentrador al 4% y un gel separador al 8 o 12%. Las muestras se trataron como sigue: Se tomaron 15 μ L de muestra y se agregaron 5 μ L de solución amortiguadora de lisis (200 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.4% azul de bromofenol, 40% glicerol, 1% β -mercaptoetanol). Las muestras fueron hervidas 7 minutos y colocadas en el gel. Se corrieron a 15 mA corriente constante. Posteriormente, se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, USA) durante 2 h a 200 mA (corriente constante) en sistema húmedo (Bio-Rad, USA), utilizando un sistema discontinuo de *buffers*. Después de la transferencia, las membranas se bloquearon 2 h con una solución al 5% de leche descremada (Carnation Nestle, USA) en una solución

amortiguadora de fosfatos (PBS). Las proteínas recombinantes se identificaron a partir de una inmunodetección en membrana de nitrocelulosa ("Western blot"). La membrana se incubó 2 h con un suero de conejo antirotavirus YM (proporcionado por la Dra. Susana López, IBT-UNAM) a una dilución de 1:3000 en PBS-0.1% leche. Después de 3 lavados con PBS-leche 0.1% (1 de 15 min y 2 de 5 min), la membrana se incubó 1h con un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Jackson Immunochemicals, USA). Después de lavar, la membrana se reveló con carbazol.

4.5. Mediciones mediante dispersión estática de luz

El análisis del ensamblaje y desensamblaje de VP6 y 2/6 PPV se realizó mediante dispersión estática de luz en el espectrofluorímetro LS-55 (Perkin-Elmer, U.K.). Para este fin se colocó el monocromador de excitación y de emisión en la misma longitud de onda y para la sensibilidad se manipuló la apertura del monocromador de emisión. Las reacciones se llevaron a cabo en una cubeta de cuarzo de 500 μ L de volumen con agitación (Perkin-Elmer, U.K.). Todos los experimentos se realizaron a temperatura controlada con baño termostatado.

4.5.1 Ensamblaje y desensamblaje de VP6

Para el desensamblaje de VP6 se colocó en la cubeta cierto volumen de muestra de VP6 a determinada concentración y se completó a 500 μ L con *buffer* Tris-EDTA (10 mM-0.1 mM) pH 8.0. Una vez estabilizada la temperatura se realizaron mediciones cada segundo y a determinado tiempo, después se añadió cierto volumen (1, 2, o 5 μ L) de una solución concentrada de CaCl_2 (1 M). La reacción fue monitoreada hasta no observar cambio en la señal de dispersión de luz.

Para el ensamblaje de VP6, se colocó en la cubeta cierto volumen de muestra VP6 desensamblada a una concentración de CaCl_2 determinada y se completó el volumen a 500 μ L con *buffer* Tris-EDTA- ZnCl_2 (10 mM-0.1 mM-1 mM) pH 8.0. Una

vez estabilizada la temperatura a 27 °C se empezaron a realizar mediciones cada segundo. A determinado tiempo se añadió cierto volumen de solución concentrada de EGTA (1 M) para quelar totalmente el calcio libre en la solución. La reacción fue monitoreada hasta no observar cambio en la señal de dispersión de luz.

4.5.2. Ensamblaje y desensamblaje de 2/6 PPV

Para el desensamblaje de 2/6 PPV se colocó en la cubeta cierto volumen de muestra de 2/6 PPV a determinada concentración y se completó a 500 µL con *buffer* Tris-EDTA-Tritón X100 (10 mM-0.1 mM-0.3%) pH 8.0. Una vez estabilizada la temperatura se empezó a realizar mediciones cada segundo y a determinado tiempo se añadió cierto volumen (1, 2, o 5 µL) de una solución concentrada de CaCl₂ (1 M). La reacción fue monitoreada hasta no observar cambio en la señal de dispersión de luz.

Para el ensamblaje de 2/6 PPV, se colocó en la cubeta cierto volumen de muestra 2 PPV (Pérez-Vargas 2001) y se completó a cierto volumen con *buffer* Tris-EDTA-Tritón X100 (10 mM-0.1 mM-0.3%). Esta solución contenía la cantidad necesaria de EGTA para remover el calcio que mantenía desensamblada a la VP6 que se añadió posteriormente. Una vez estabilizada la temperatura se adicionó cierto volumen de VP6 desensamblada en *buffer* con CaCl₂ (el calcio es necesario para mantener la estructura en estado monomérico) y se monitoreo la reacción cada segundo hasta alcanzar la estabilización de la señal.

4.6. Anisotropía de fluorescencia

Las mediciones de anisotropía fueron realizadas en el sistema de polarización de fluorescencia Beacon 2000 (Invitrogen, USA), con control de temperatura y volumen de reacción de 100 µL. La preparación de las muestras fue igual a los análisis de dispersión de luz, solamente que el volumen de reacción fue de 100

μL . La longitud de onda de excitación fue de 484 nm y la longitud de onda de emisión de 510.

4.7. Microscopía electrónica

El análisis mediante microscopía electrónica se realizó mediante la técnica de tinción negativa. 25 μL de muestra se fijaron en rejilla de 200 *mesh* (con Formvar y carbón) durante 3 min. Posteriormente se lavó con agua la rejilla y se colocó en contacto con 25 μL de solución de acetato de uranilo (4% acuoso) durante 3 min. Se lavó la rejilla con agua y se dejó secar bajo luz de lámpara. La observación se realizó en microscopio electrónico Zeiss EM 900 (Zeiss, Alemania) en aumentos desde 3,500 hasta 140,000.

4.8. Consideraciones matemáticas

4.8.1. Análisis matemático del ensamblaje y desensamblaje de VP6 y 2/6 PPV

Los datos obtenidos por dispersión de luz fueron normalizados con respecto a la señal obtenida durante el tiempo de estabilización según la **Ecuación 4.1**.

$$LS_{normalizado} = \frac{LS_t}{LS_o} \quad \text{Ecuación 4.1 Normalización de la dispersión de luz}$$

Donde $LS_{normalizado}$ es la señal de dispersión de luz normalizada, LS_t es la señal de dispersión de luz al tiempo t y LS_o es la señal de dispersión de luz al tiempo 0. Los resultados de cada reacción (cada ensayo fue realizado por triplicado) fueron analizados con el Software Origin 7.0 (OriginLab Corporation. U.S.) y ajustados según el modelo planteado para cada caso. Las velocidades de reacción y ΔG de reacción fueron promediados para cada condición establecida.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

La estrategia experimental seguida en este trabajo fue la siguiente:

- Análisis de la localización celular de las proteínas estructurales de rotavirus (GFPVP2 y VP6) cuando fueron expresadas en células de insecto con el objetivo de determinar el lugar de ensamblaje de la 2/6 PPV. Los resultados se muestran en el artículo “Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. Journal of Biotechnology 122: 443–452” en la **Sección 5.1**. Estos resultados fueron utilizados posteriormente para proponer estrategias de coinfección.
- Desarrollo de un método cromatográfico para la caracterización y cuantificación de la 2/6 PPV. Este método que fue publicado en el artículo “Analysis and quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography. Journal of Chromatography B. 824: 267-276” y está en la **Sección 5.2**. La relevancia de esta metodología es que permitió diferenciar y cuantificar la 2/6 PPV del resto de las estructuras presentes (baculovirus y proteínas no ensambladas) en muestras de proceso utilizando únicamente 200 µL de muestra, tarea que no era posible con las metodologías existentes.
- Implementación del sistema de fases acuosas para la recuperación de la 2/6 PPV producidas en el sistema de CI-BV, con el objetivo de tener un método de purificación sencillo y rápido que permitiera obtener cantidades apreciables de 2/6 PPV para ser empleadas en el estudio de ensamblaje *in vitro*. Este trabajo está en la **Sección 5.3** y fue publicado en el artículo “Rotavirus-like particles primary recovery from insect cells in aqueous two-phase systems. Journal of Chromatography B 842: 48-57”.

- Desarrollo de estrategias de purificación de 2/6 PPV y túbulos de VP6, para tener un proceso integral de producción de PPV y obtener material de adecuada calidad para los experimentos siguientes (**Sección 5.4**).
- Con el objetivo de entender el ensamblaje de las PPV en las células de insecto, se estudió en la **Sección 5.5**, el desensamblaje y ensamblaje *in vitro* de los túbulos de VP6 y la 2/6 PPV. Estos resultados son relevantes porque por primera vez se describe el proceso de ensamblaje *in vitro* de las PPV de rotavirus. Además, estos resultados fueron determinantes en la definición de las estrategias de coinfección para la producción de la 2/6 PPV.
- Evaluación de diferentes estrategias de coinfección mediante citometría de flujo, para determinar cuál estrategia satisface las condiciones determinadas en las secciones anteriores. Este trabajo ha sido sometido y revisado en el artículo “Population kinetics during simultaneous infection of insect cells with two different recombinant baculoviruses for the production of rotavirus-like particles. BMC Biotechnology” **Sección 5.6**.
- Por último, con todos los resultados obtenidos en las secciones anteriores, se planteó en la **Sección 5.7** la producción de la 2/6 PPV con las diferentes estrategias de coinfección propuestas. La evaluación de estas estrategias se realizó mediante la cuantificación de la 2/6 PPV producida y la eficiencia de ensamblaje de las proteínas estructurales.

5.4. Desarrollo de estrategias de purificación de VP6 y 2/6 PPV producidas en el sistema CI-BV

5.4.1. Purificación de VP6

La proteína VP6 al ser expresada en células de insecto se autoensambla en túbulos de 70 nm (Mena *et al.*, 2006) y esta característica es aprovechada para su purificación mediante permeación en gel. En un cultivo de VP6, la concentración promedio de proteína alcanzada es de 200 µg/mL y el volumen de producción puede ser de 0.5 a 1 L.

En la **Figura 5.1** está el proceso de purificación planteado para VP6 a partir del sobrenadante. Este proceso de purificación tiene dos etapas cromatográficas incluidas. Una es el intercambio aniónico y la otra es la cromatografía líquida de permeación en gel (FPL-GP). La etapa de intercambio iónico tiene como objetivo, la remoción del baculovirus recombinantes y ácidos nucleicos residuales. La resina de intercambio aniónico usada fue 40 mL de Q Sepharose Fast Flow (GE Healthcare, USA) empacada en una columna XK-16 (GE Healthcare, USA). El pH del *buffer* de carga fue 6.16. Este pH fue escogido debido a que es el punto isoeléctrico teórico de VP6, entonces los túbulos de VP6 no interaccionarán con la resina mientras que la proteína gp64 ($PI_{teórico}$ 5.5), que recubre al baculovirus y de igual manera los grupos fosfato de los ácidos nucleicos quedarían retenidos en la columna.

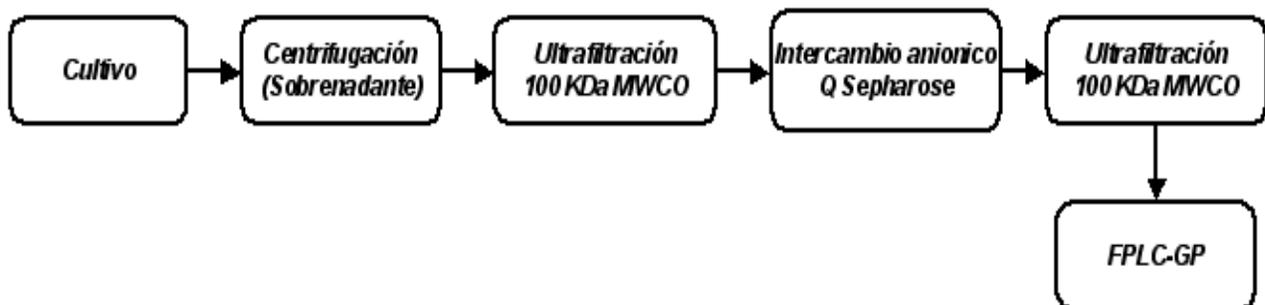


Figura 5.1. Esquema de purificación de VP6.

En la **Figura 5.2.A** se puede observar un cromatograma típico de la etapa de intercambio iónico. El primer pico fue recolectado y sometido al resto del proceso. Una vez que el pico 1 fue ultrafiltrado se inyectó a la columna de permeación en gel. Esta es una columna de 1.20 m de largo por 2.6 cm de diámetro. El volumen empacado fue de 420 mL con la resina HW-65F (TOSOH Corporation, Japón). Esta resina tiene un tamaño de poro similar (200 nm) a la columna UltraHydrogel 2000 usada en la cuantificación de 2/6 PPV. El *buffer* de corrida fue el mismo que usó Mena *et al.* (2005) a un flujo de 2.5 mL/min. En la **Figura 5.2.B** está el cromatograma típico de una muestra de VP6 purificada por permeación en gel. El primer pico correspondiente a macroestructuras fue recolectado y los picos restantes fueron descartados, ya que no corresponden a macroestructuras tubulares de VP6.

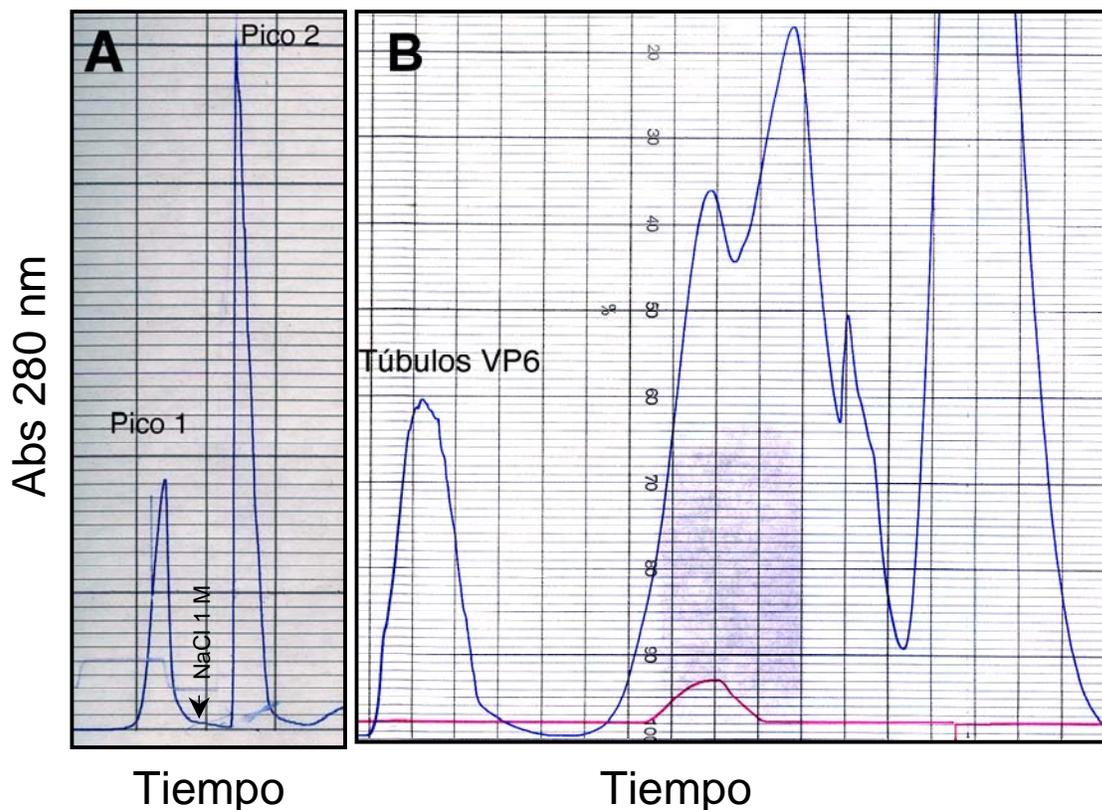


Figura 5.2. Cromatogramas típicos de la purificación de VP6. **A.** Etapa de intercambio iónico. **B.** Etapa de permeación en gel.

En la **Figura 5.3** se encuentra el análisis por geles de poliacrilamida y “western blot” de las diferentes etapas de purificación de VP6.

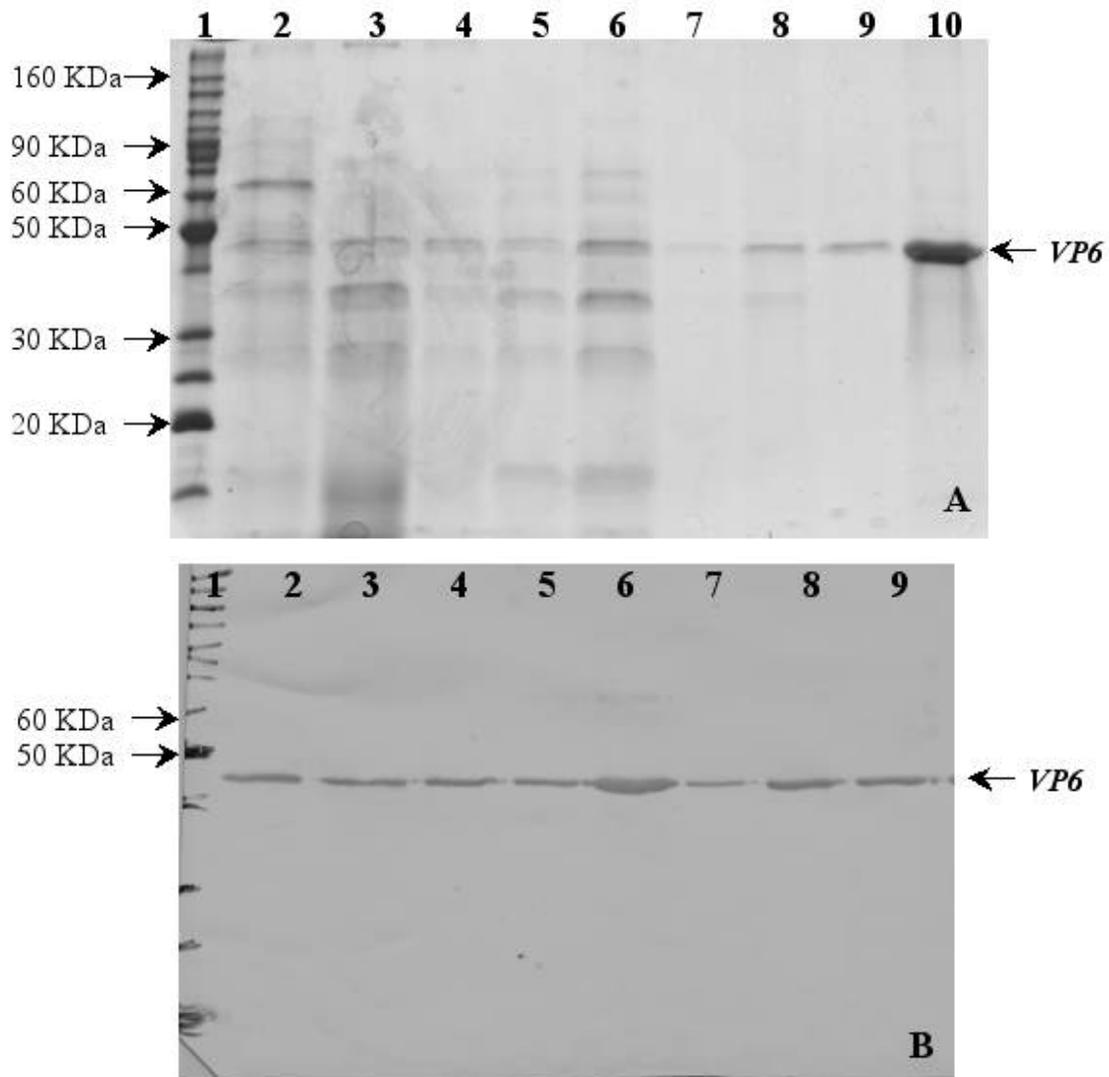


Figura 5.3. Análisis del proceso de purificación de VP6. **A.** Análisis por SDS-PAGE. Línea 1: Marcador de peso molecular. Línea 2: sobrenadante de cultivo. Línea 3: después de ultrafiltración. Línea 4: Pico 1 intercambio aniónico (ver Figura 5.2.A). Línea 5: pico 2 intercambio aniónico (ver Figura 5.2.A). Línea 6: Ultrafiltración de Pico 1 de intercambio aniónico. Línea 7: Permeado de ultrafiltración de Pico 1 de intercambio aniónico. Línea 8: Pico 1 de permeación en gel, corrida #1. Línea 9: Pico 1 de permeación en gel, corrida #2. Línea 10: Ultrafiltración de Pico 1 de permeación en gel. **B.** Análisis por “western-blot” de las muestras en A.

El rendimiento global del proceso fue de 20% (**Tabla 5.1**), pero hay que tener en cuenta que sólo se está purificando la proteína VP6 que está ensamblada en túbulos. El resto de la proteína que no esté ensamblada en forma tubular, no es recolectada en la última etapa (permeación en gel).

En la **Figura 5.4** se observan los túbulos de VP6 que fueron purificados con esta metodología. Este método de purificación de túbulos de VP6 es robusto, sencillo, rápido (8 h), fácilmente escalable y el producto final presenta una pureza bastante aceptable (98%).

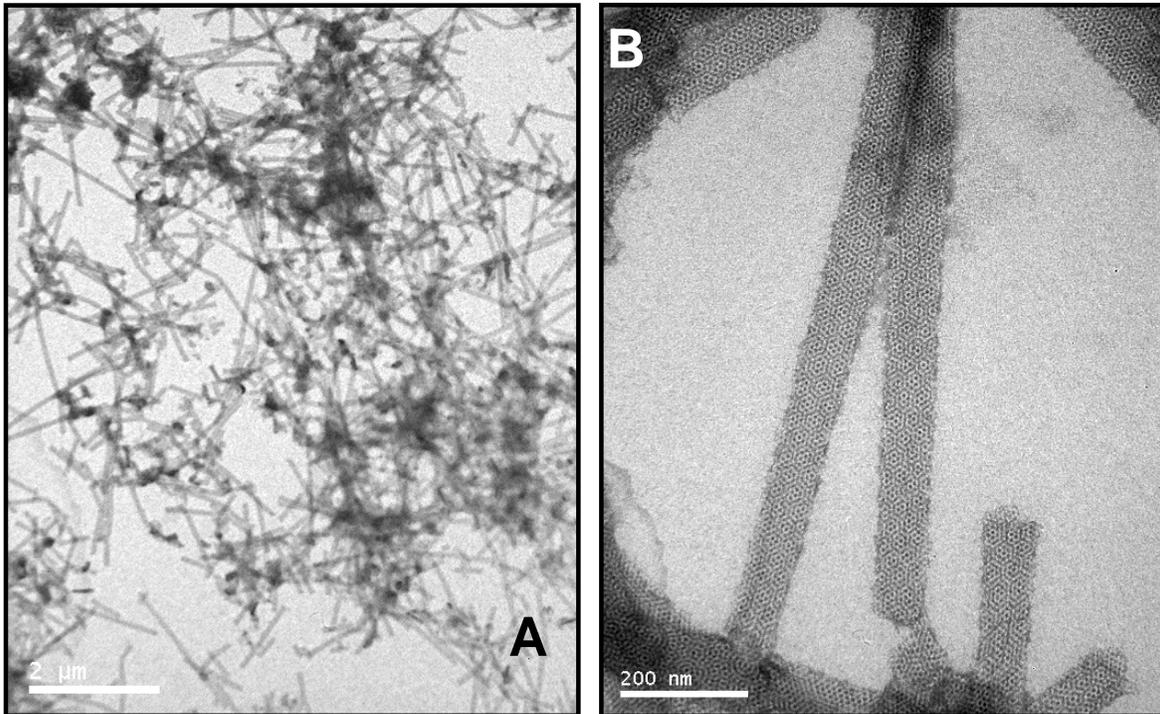


Figura 5.4. Túbulos de VP6 obtenidos mediante el proceso de purificación planteado. **A.** Microscopia electrónica a 7000 X. **B.** Microscopia electrónica a 85,000X. Foto tomada por Jimmy Mena y Germán Plascencia.

Tabla 5.1. Purificación de túbulos de VP6 mediante intercambio aniónico y permeación de gel.

Etapa	Volumen (mL)	VP6 ($\mu\text{g/mL}$)	VP6 (mg)	% Rendimiento
Sobrenadante	500	281.4	140.7	100
Ultrafiltración*	250	411.8	102.9	73.1
Intercambio Aniónico	250	271.4	67.7	48.1
Ultrafiltración*	100	531	56.1	39.8
Permeación en gel	180	265.2	47.7	33.9
Ultrafiltración*	50	579.5	28.9	20.5

* La membrana de ultrafiltración es de 30,000 MWCO

5.4.2. Purificación de 2/6 PPV

Una de las limitaciones en la producción de PPV es su purificación. Los métodos tradicionales de purificación de PPV se basan en una centrifugación isopícnica. Este proceso es costoso, demorado, con bajos rendimientos y difícilmente escalable a nivel industrial. Una de las estrategias propuestas en este trabajo es la purificación de las PPV de rotavirus mediante estrategias cromatográficas que aprovechen la diferencia en tamaño (estructuras mayores de 50 nm) con respecto al resto de los componentes celulares.

Una producción típica de 2/6 PPV resulta en aproximadamente de 2 a 4 $\mu\text{g/mL}$ y tiene un volumen de 1 L. Esto significa un total de a 2 a 4 mg de PPV para purificar. En el caso de la 2/6 PPV es necesario purificar las PPV tanto en el sobrenadante como en el *pellet* celular, ya que hemos determinado que una cantidad de 2/6 PPV permanece dentro de la célula.

En este trabajo se plantearon dos estrategias para la purificación de la 2/6 PPV. Una contempla las mismas etapas usadas para la purificación de los túbulos de VP6 (intercambio aniónico y permeación en gel) y otra que usa el sistema de fases acuosas a nivel preparativo a partir de los resultados publicados por Benavides *et al.* (2006).

Inicialmente se trabajó con el sobrenadante y en la **Figura 5.5** está el diagrama de flujo de las dos estrategias propuestas. Durante el proceso de purificación, la concentración y pureza de las PPV fueron analizadas mediante la metodología cromatográfica reportada en este trabajo (Mena *et al.*, 2005, **Sección 5.2**). Las etapas de intercambio aniónico y fases acuosas se implementaron como alternativas para la remoción, especialmente de ácidos nucleicos, que son contaminantes importantes en las muestras de 2/6 PPV.

La etapa de intercambio aniónico cumplió con el objetivo de remover los ácidos nucleicos (relación $260/280=1.1605$) pero hubo un bajo porcentaje de recuperación de PPV con el intercambio aniónico (**Tabla 5.2**). Mediante la purificación con fases acuosas fue posible incrementar el rendimiento del proceso de 39.2% (esquema con intercambio iónico) a 61.7%. (**Tabla 5.3**).

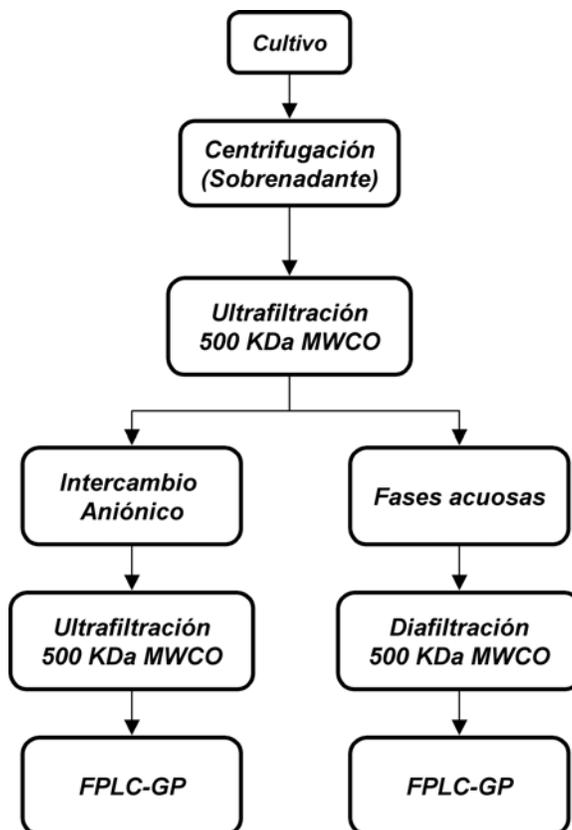


Figura 5.5. Esquema de purificación de 2/6 PPV del sobrenadante. Se muestran dos estrategias alternativas.

Tabla 5.2. Purificación de 2/6 PPV en sobrenadante mediante intercambio aniónico y permeación de gel.

Etapa	Volumen (mL)	2/6 PPV (ng/mL)	2/6 PPV (μ g)	Relación 260/280	% Rendimiento	% Pureza
Sobrenadante	100	1175	117.52	1.2587	100	0.27
Ultrafiltración*	50	1873	93.6	1.2872	79.7	0.32
Intercambio Aniónico	50	1254	62.7	1.1605	53.36	2.57
Ultrafiltración*	18	3355	60.4	1.1803	51.4	n.d.
Permeación en gel	80	576	46.2	1.1024	39.23	84.9

* Columna de fibras huecas de 500,000 MWCO

En la **Figura 5.6.A** se observa un cromatograma típico de permeación en gel de una muestra en purificación que contiene la 2/6 PPV. El primer pico corresponde a la 2/6 PPV (**Figura 5.6.B**) y los restantes corresponden a componentes celulares o proteína no ensamblada.

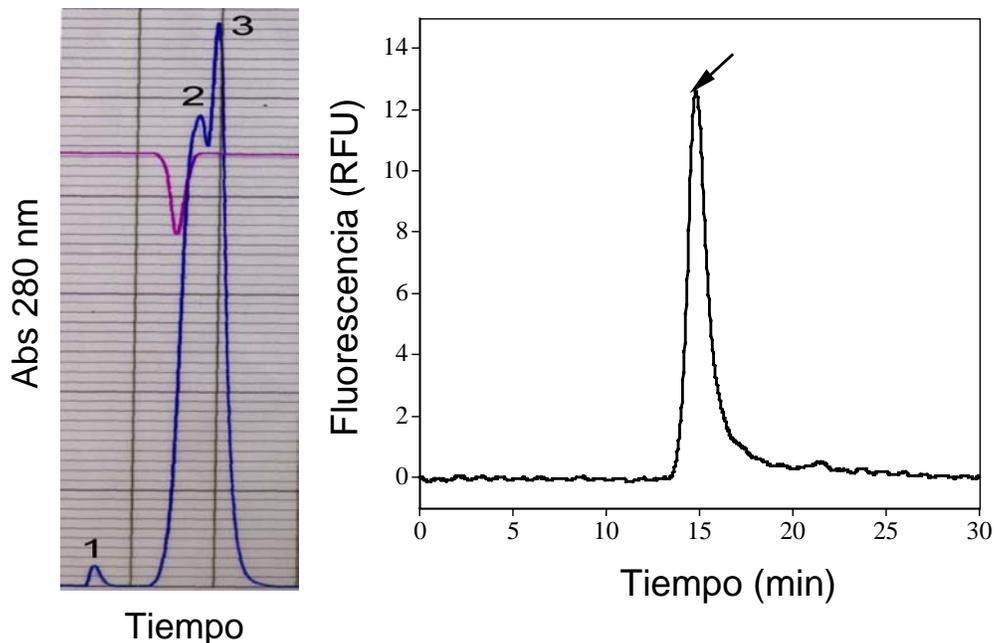


Figura 5.6. A. Cromatograma de la etapa de permeación en gel de la purificación de 2/6 PPV. **B.** Caracterización del pico 1 de **Figura 5.6.A** mediante el método de Mena *et al.* (2005).

Tabla 5.3. Purificación de 2/6 PPV en sobrenadante mediante fases acuosas y permeación de gel.

Etapa	Volumen (mL)	2/6 PPV (ng/mL)	2/6 PPV (μg)	Relación 260/280	% Rendimiento	% Pureza
Sobrenadante	500	503.4	251.7	1.269	100	0.27
Ultrafiltración*	50	4505	255.8	1.2972	89.5	0.32
Fases acuosas	20	10093	201.8	1.1806	80.2	2.61
Diafiltración**	50	3488	174.4	1.03	69.3	2.66
Permeación en gel	250	621	155.3	1.091	61.7	95.8

* Columna de fibras huecas de 500,000 MWCO. ** En la diafiltración se cambió el *buffer* PEG-fosfatos por el *buffer* Tris-EDTA (Benavides *et al.*, 2006).

Con respecto al *pellet* celular se implementó el diagrama de la **Figura 5.7**. En este proceso no se obtuvieron resultados satisfactorios del intercambio aniónico, por lo que no se integró al esquema de purificación. En la **Tabla 5.4** se encuentran los resultados de la purificación de la 2/6 PPV a partir del *pellet* celular.

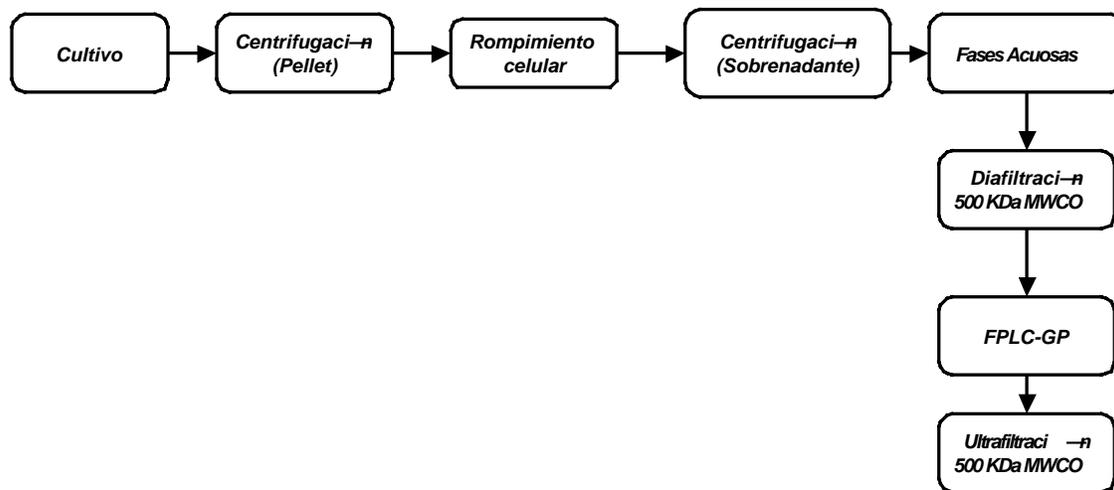


Figura 5.7. Esquema de purificación de 2/6 PPV presente en el *pellet* celular.

En la extracción con fases acuosas fue necesario implementar nuestra recomendación (Benavides *et al.*, 2006) de realizar una segunda extracción para incrementar el rendimiento al 80%.

Tabla 5.4 Purificación de 2/6 PPV en el *pellet* celular mediante fases acuosas y permeación de gel.

Etapa	Volumen (mL)	2/6 PPV (ng/mL)	2/6 PPV (μg)	Relación 260/280	% Rendimiento	% Pureza
<i>Pellet</i>	50	3100	155	1.8197	100	1.3
Fases acuosas	250	545	138.25	1.69	87.9	2.1
Diafiltración*	90	1302	117.18	1.59	75.8	3.98
Permeación en gel	250	396	99.04	1.2	63.9	79.7
Ultrafiltración**	90	978	88.04	1.152	58.8	94.5

* En la diafiltración se cambió el *buffer* PEG-fosfatos por el *buffer* Tris-EDTA (Benavides *et al.*, 2006). ** Columna de fibras huecas de 500,000 MWCO.

La purificación de PPV mediante el esquema que implementa las fases acuosas es un proceso fácilmente escalable, que en este trabajo se desarrolló a nivel preparativo (500 mL) y puede ser empleado a nivel industrial.

5.5. Estudio *in vitro* del ensamblaje y desensamblaje de PPV de rotavirus.

Cuando las proteínas GFPVP2 y VP6 fueron expresadas en células de insecto, éstas se autoensamblaron formando nucleocápsides (GFPVP2), túbulos (VP6) o la 2/6 PPV (Mena *et al.*, 2006). En la **Sección 5.1** también se observó que la presencia de GFPVP2 inhibió la formación de los túbulos de VP6. Además que probablemente fue necesario una concentración mínima de GFPVP2 y VP6 para iniciar el ensamblaje de las cápsides o los túbulos, ya que a las 24 hpi el patrón de localización de ambas proteínas fue difuso, pero a las 48 hpi este patrón ya era definido. Y aunque la coexpresión de las dos proteínas dio como resultado la formación de la 2/6 PPV, no se determinó cuál es el proceso de ensamblaje. Por lo tanto, para determinar cuál es el proceso del ensamblaje de la 2/6 PPV se estudió el ensamblaje de VP6 y la 2/6 PPV *in vitro*.

5.5.1 Desensamblaje y ensamblaje de VP6

Lepault *et al.* (2001) determinaron que VP6 presenta polimorfismo estructural dependiendo del pH, fuerza iónica y concentración de Ca^{++} presentes. Cuando se expresa VP6 en las células de insecto se obtienen túbulos de 70 nm en diámetro y varias μm en longitud. Fue posible purificar los túbulos mediante el proceso de purificación desarrollado durante este proyecto (**Sección 5.4**). En la **Figura 5.8** se observa la caracterización de los túbulos mediante electroforesis y microscopía electrónica.

Los túbulos de VP6 también fueron caracterizados por cromatografía líquida de permeación en gel (HPLC-GP). Como estándares de tamaño se usaron proteínas globulares de radio hidráulico (R_h) conocido (R_h es el radio que tendría una proteína si fuera completamente esférica). También se usó como estándar de tamaño, nanoesferas de 100 nm de diámetro aproximadamente. En la **Figura 5.9** se observa la curva de calibración de la columna UltraHydrogel 500 y la caracterización de los túbulos de VP6. La muestra de VP6 es excluida de la columna, lo que indica que está compuesta solamente de túbulos.

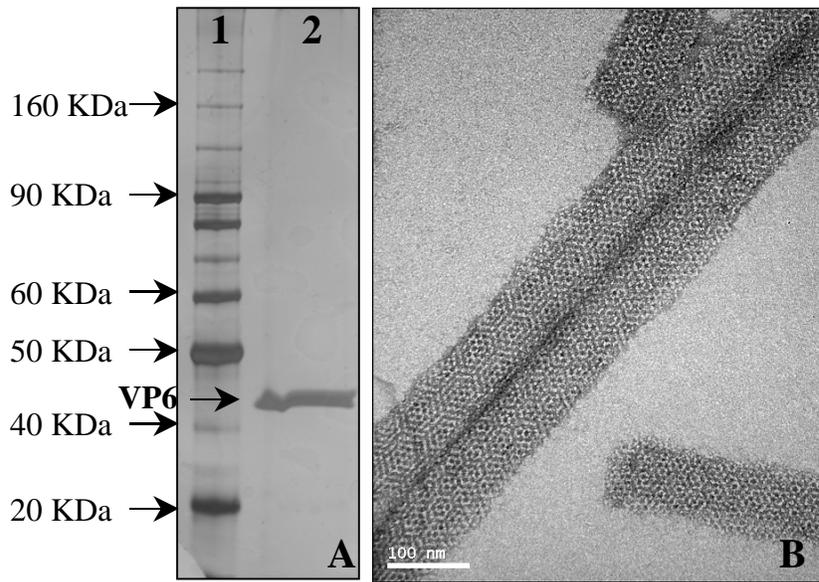


Figura 5.8. Caracterización de los túbulos de VP6 **A.** Gel teñido con azul de comassie. 1. PM. 2. Muestra de VP6 utilizada en los estudios. **B.** Microscopía electrónica de VP6

Lepault *et al.* (2001) reportaron que los túbulos de VP6 se pueden desensamblar en trímeros mediante la adición de CaCl_2 . Entonces, inicialmente se estudió el desensamblaje de los túbulos de VP6 a diferentes concentraciones de Ca^{++} mediante la técnica de dispersión de luz. Brevemente, la técnica consiste en que las macroestructuras dispersan más un haz de luz monocromático polarizado que las estructuras de menor tamaño. Por lo tanto, al desensamblar los túbulos a estructuras de menor tamaño, la señal de dispersión de luz disminuirá.

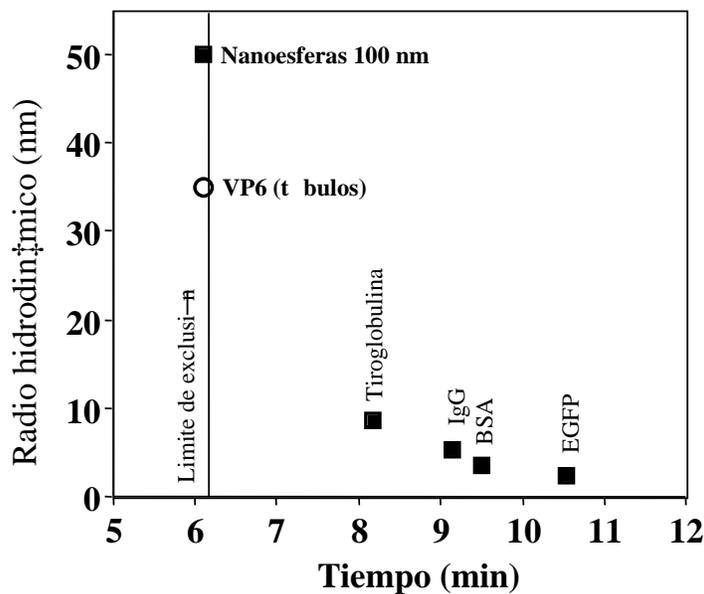


Figura 5.9. Caracterización de la muestra de VP6 por HPLC-GP. Las proteínas fueron monitoreadas por fluorescencia de Trp (λ_{exc} : 280 nm; λ_{emi} : 348 nm). Tiroglobulina (650 KDa,), IgG (150 KDa) BSA (66 KDa) EGFP (27 KDa) . La nanoesfera de 100 nm fue monitoreada a λ_{exc} : 480 nm; λ_{emi} : 510 nm,

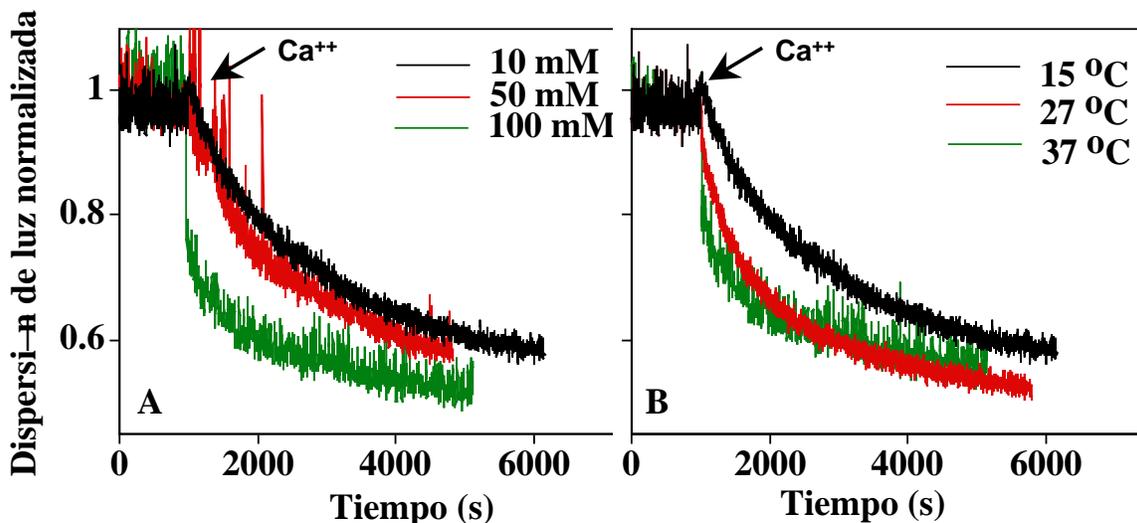


Figura 5.10. Desensamblaje de túbulos de VP6 (1 μM). **A.** Reacción a diferentes concentraciones de Ca^{++} a 27 °C (300 °K). **B.** Reacción a diferentes temperaturas y 10 mM Ca^{++} .

En la **Figura 5.10** se observa que el desensamblaje de VP6 no es espontáneo, y solo empieza después de la adición de Ca^{++} (1000 s después aproximadamente). También se observa que al incrementar la concentración de Ca^{++} o la temperatura, incrementa la velocidad de reacción. Para determinar en qué estructura se desensamblaron los túbulos, el producto de la reacción fue caracterizado por HPLC-GP, y la estructura final corresponde a monómeros de VP6 (44.5 KDa) (**Figura 5.11**).

La reacción de desensamblaje (**Figura 5.10**) presentó un comportamiento de decaimiento exponencial. Inicialmente se consideró la desaparición de los túbulos en un solo paso hacia monómeros, lo que debería ser una reacción de primer orden, pero al hacer el ajuste a un modelo de primer orden, el coeficiente de correlación de los datos no fué aceptable. Entonces se planteó la alternativa de una reacción en dos pasos. Diferentes autores han reportado que la estructura que se obtiene al desensamblar los túbulos con calcio son trímeros de VP6 (Lepault *et al.*, 2001; Mathieu *et al.*, 2001). En este estudio se observó que la estructura que resultó al desensamblar los tubulos de VP6 fué monomérica. Esto plantea que probablemente exista en este proceso de desensamblaje un intermediario y este sea VP6 trimérica.

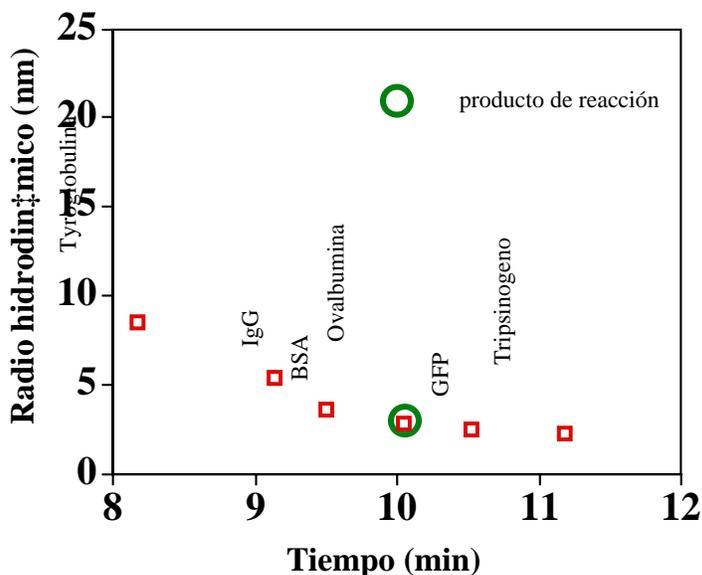


Figura 5.11. Caracterización del producto de reacción por HPLC-GP. Tiroglobulina (650 KDa), IgG (150 KDa), BSA (66 KDa), Ovalbumina (43 KDa), EGFP (27 KDa) y Tripsinogeno (12.5 KDa).

Para corroborar si existe un intermediario en el desensamblaje de los túbulos de VP6, se realizó el desensamblaje a condiciones similares a las reportadas por Lepault *et al.* (2001). La concentración de proteína utilizada por estos autores fue 10 mg/mL (224 μ M) de VP6 y 100 mM de CaCl_2 . Cabe resaltar que la concentración empleada en nuestro estudio fue 1 μ M de VP6 (224 veces menor). El desensamblaje de túbulos de VP6 a 200 μ M no se desencadenó a concentraciones de calcio menores de 100 mM. En la **Figura 5.12** se observa el cromatógrama de la reacción a 200 μ M de VP6 y su comparación con producto de reacción a 1 μ M de VP6. El producto de la reacción fue analizado mediante HPLC-GP y se determinó que era una estructura con un peso molecular aproximado de 130 KDa, lo que correspondería a trímeros de VP6. Esto indicaría que en el desensamblaje por Ca^{++} a bajas concentraciones de VP6 (1 μ M) el trímero es inestable, por lo que la estructura final es el monómero, mientras que a mayores concentraciones como las utilizadas por Lepault *et al.* (2001), el resultado es el trímero.

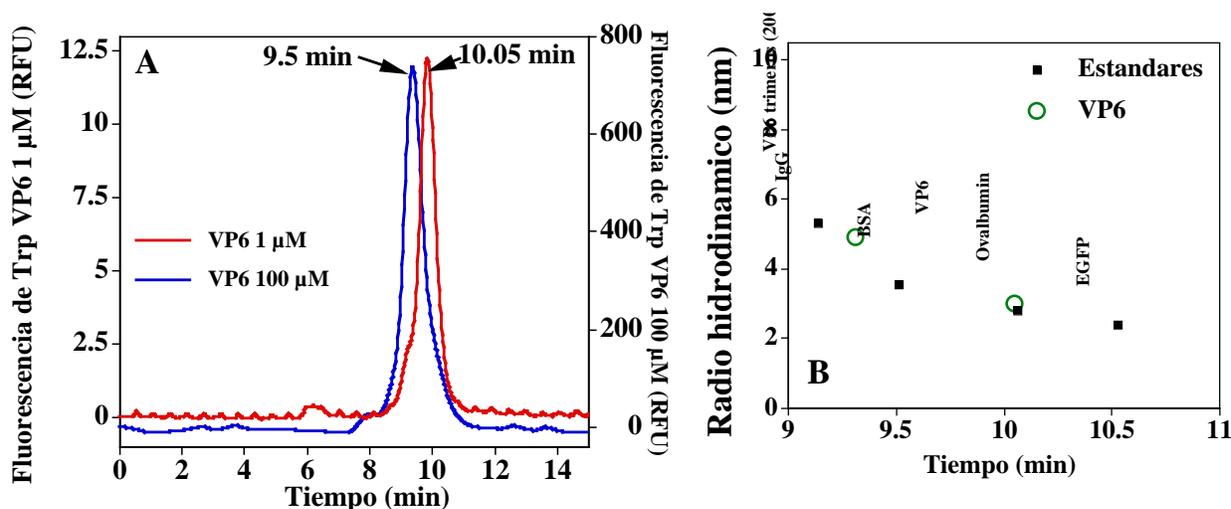


Figura 5.12. Caracterización del producto de reacción de desensamblaje a 1 y 100 μM de VP6 por HPLC-GP. **A.** Cromatogramas. **B.** Curva estándar por HPLC-GP. Tiroglobulina (650 KDa), IgG (150 KDa), BSA (66 KDa), Ovalbumina (43 KDa), EGFP (27 KDa) y Tripsinogeno (12.5 KDa).

Entonces se planteó un modelo de decaimiento exponencial (**Ecuación 5.1**) de dos etapas, como se puede observar en las cinéticas de desensamblaje. Una primera etapa bastante rápida al inicio de la reacción (túbulo a trímero) y una segunda etapa (trímero a monómero) más lenta hacia el final de la reacción. El ajuste de este modelo a los datos experimentales fue aceptable ($R^2 = 0.987$).

$y = y_0 + A_1 e^{-k_1 t} + A_2 e^{-k_2 t}$ **Ecuación 5.1.** Ecuación de decaimiento exponencial en dos etapas, donde y_0 es la dispersión de luz al inicio de la reacción; t es el tiempo; A_1 es la amplitud de la primera etapa; k_1 es la velocidad de reacción de la primera etapa; A_2 es la amplitud de la segunda etapa; k_2 es la velocidad de reacción de la segunda etapa.

En la **Figura 5.13** se puede observar una relación directamente proporcional entre las velocidades de reacción (k_1 y k_2) y la temperatura. Aunque el efecto es más pronunciado en k_1 , que incrementó 162 % mientras que k_2 solo aumento 30 % en el rango de temperatura evaluado. Este comportamiento es más claro en el ΔG^0 de reacción del desensamblaje de los túbulos, en donde para la primera etapa (k_1) el ΔG fue -6.8 kcal/mol (± 0.8 kcal/mol), mientras para la segunda etapa (k_2) fue -2.14 kcal/mol (± 0.3 kcal/mol) (**Tabla 5.5**).

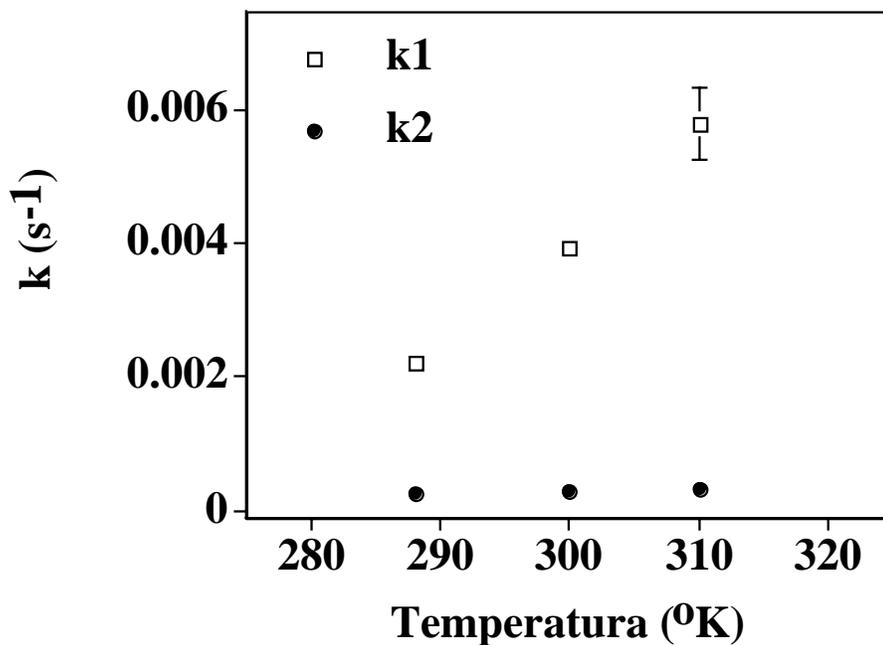


Figura 5.13. Velocidades de reacción a diferentes temperaturas del desensamblaje de túbulos de VP6.

Tabla 5.5. Parámetros cinéticos y termodinámicos del desensamblaje de túbulos a 1 μ M VP6.

CaCl ₂ (mM)	Temperatura (°C)	k ₁ (s ⁻¹)	k ₂ (s ⁻²)	ΔG° etapa 1 (kcal/mol)	ΔG° etapa 2 (kcal/mol)
10	15	2.2*10 ³	2.5*10 ⁴	-7.8	-2.07
	27	3.9*10 ³	2.8*10 ⁴		
	37	5.7*10 ³	3.3*10 ⁴		
50	15	2.8*10 ³	3.9*10 ⁴	-6.2	-1.92
	27	3.6*10 ³	4.8*10 ⁴		
	37	6.2*10 ³	4.9*10 ⁴		
100	15	3.1*10 ³	3.2*10 ⁴	-6.6	-2.45
	27	5.6*10 ³	3.9*10 ⁴		
	37	7.1*10 ³	4.4*10 ⁴		

Una probable explicación para la diferencia de velocidades de reacción entre las etapas puede estar en los 5 sitios de interacción con calcio que tiene VP6 en su estructura. Tres sitios están en la zona de interacción para el ensamblaje en túbulos o esfera. Los otros dos están en la zona de trimerización y no están expuestos al solvente (Lepault *et al.*, 2001). Un probable mecanismo del desensamblaje por calcio, es una primera etapa (k_1) de desestabilización de los túbulos por la interacción de VP6 con el calcio en los tres sitios accesibles al solvente y una segunda etapa (k_2) la interacción de Ca^{++} con los otros dos sitios que no son fácilmente accesibles, y por ende la desestabilización de los trímeros. Este comportamiento explicaría la diferencia en las velocidades de reacción y ΔG° . Puesto que ambos ΔG° son negativos, esto significa que la reacción es espontánea (al añadir calcio), pero el ΔG° de reacción de la primera etapa es tres veces menor, probablemente debido a la fácil accesibilidad del calcio a las tres zonas de interacción de VP6 en los túbulos.

Aunque la **Ecuación 5.1** describe un proceso de desensamblaje en dos etapas, esto no excluye la presencia de otros estados intermedios, y puede ser que el desensamblaje tenga otras reacciones paralelas o en serie pero de bajo orden de reacción, que no son significativas cinéticamente.

El siguiente enfoque fue ensamblar los túbulos a partir de monómeros de VP6 mediante la quelación del calcio con EGTA. En la **Figura 5.14** se pueden observar las cinéticas de ensamblaje de VP6 a diferentes concentraciones y 27°C . En estos experimentos fue necesario adicionar Zn^{++} para favorecer la trimerización (Mathieu *et al.*, 2001).

El ensamblaje de VP6 fue un proceso concentración-dependiente, puesto que fue necesario incrementar la concentración de VP6 10 veces ($10\ \mu\text{M}$) para iniciar la reacción. Además, al incrementar la concentración de VP6 20 veces ($20\ \mu\text{M}$), también aumentó la velocidad de reacción de ensamblaje. Cabe resaltar que a la misma concentración que se realizó el desensamblaje ($1\ \mu\text{M}$), en el ensamblaje no hubo reacción.

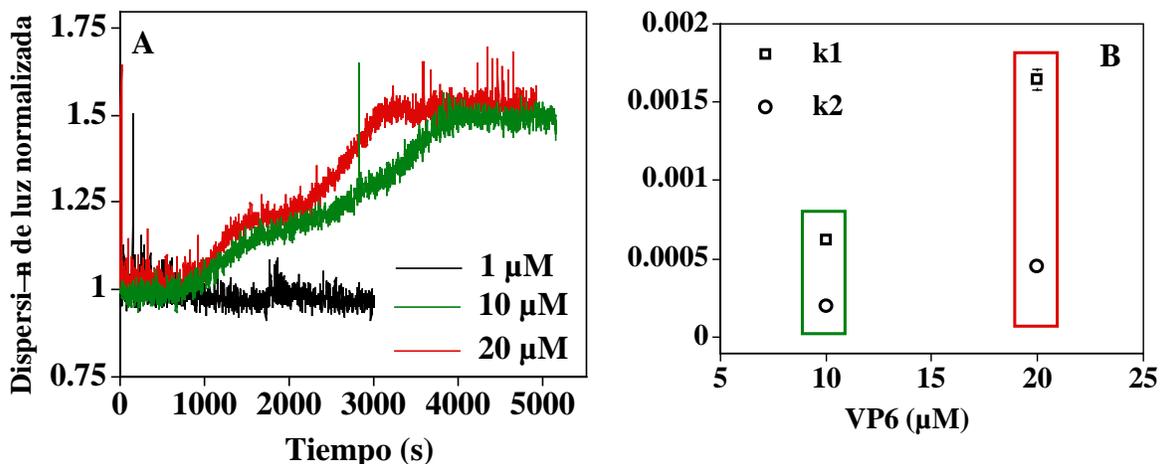


Figura 5.14. Ensamblaje de VP6 a diferentes concentraciones y 27 °C. **A.** Cinéticas de ensamblaje analizadas por dispersión de luz. **B.** Velocidades de reacción de ensamblaje de VP6. k_1 corresponde a la etapa de 0 a 2000 s y k_2 a la etapa de 2500 s en adelante.

Al analizar el producto de reacción por HPLC-GP se observó que a 1 μM de VP6 la estructura predominante es VP6 monomérica (10.05 min), pero a 10 μM y 20 μM de VP6, el pico de 10.05 min disminuyó e incrementó el pico correspondiente a túbulos de VP6 (6.01 min). Para confirmar que el producto del ensamblaje son túbulos, se realizó microscopía electrónica del ensamblaje a 20 μM de VP6 y se observaron túbulos de 70 nm (**Figura 5.15**).

En el ensamblaje de VP6 se observan más claramente las etapas de trimerización y formación de túbulos. Para determinar las velocidades de reacción fue necesario dividir las cinéticas en dos procesos de primer orden. Una primera etapa desde 0 a 2000 s y otra etapa de 2500 s en adelante. La **Ecuación 5.2** describe la reacción de ensamblaje.

$y = y_0 + Ae^{-k \cdot t}$ **Ecuación 5.2.** Ecuación de crecimiento exponencial, donde y_0 es el punto inicial; t es el tiempo; A es la amplitud; k_1 es la velocidad de reacción.

La primera etapa corresponde a la trimerización y es en esta etapa donde es más importante el efecto de la concentración de VP6, puesto que a 20 μM , la velocidad de reacción (k_1) fue 200% mayor en comparación a 10 μM (**Tabla 5.6**). Posteriormente, se observó una segunda fase de ensamblaje de trímeros en túbulos, en la cual el efecto de la concentración no fue tan pronunciado. Que el

ensamblaje no se inicie a concentración de 1 μM indica que probablemente la energía de interacción entre VP6 para trimerizar es baja y por lo tanto, exista una etapa de nucleación (Zlotnick *et al.*, 2002). Esa etapa de nucleación se observó en la fase lag del ensamblaje a 10 μM y 20 μM . En esta fase de nucleación, la velocidad de trimerización es baja y es necesario alcanzar una concentración mínima de trímeros para desencadenar el ensamblaje. Estos resultados explicarían lo observado por Mena *et al.* (2006) en células de insecto, donde a las 24 hpi se observó la proteína VP6 difundida en el citoplasma, pero a las 48 hpi ya se observaron túbulos. Probablemente a las 24 hpi, no se ha alcanzado la concentración mínima para sobrepasar la etapa de nucleación y tener VP6 como túbulos.

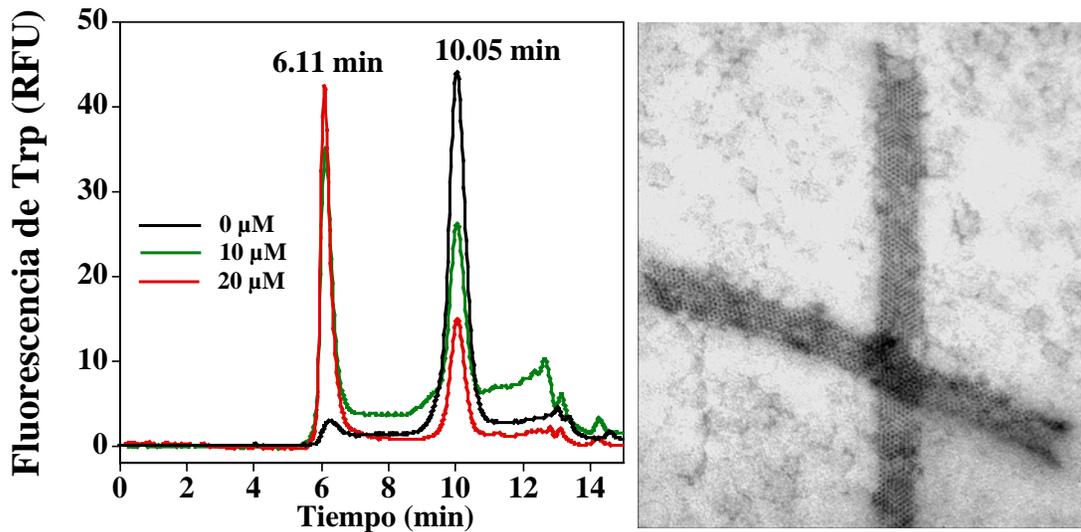


Figura 5.15. Análisis del producto de reacción del ensamblaje de VP6. **A.** Cromatógrama del producto de reacción a diferentes concentraciones de VP6. **B.** Micrografía electrónica del producto de reacción a 20 μM de VP6.

Tabla 5.6 Parámetros cinéticos del ensamblaje de VP6 a 27°C

VP6 (M)	k1 (s-1)	k1 Desv. Est. ($\pm\text{s-1}$)	k2 (s-1)	k2 Desv. Est. ($\pm\text{s-1}$)
10	$6.19 \cdot 10^{-4}$	$2.93 \cdot 10^{-5}$	$4.98 \cdot 10^{-4}$	$2.14 \cdot 10^{-5}$
20	$1.64 \cdot 10^{-3}$	$6.9 \cdot 10^{-5}$	$4.5 \cdot 10^{-4}$	$2.62 \cdot 10^{-5}$

n.d. no determinado

5.5.2 Desensamblaje y ensamblaje de 2/6 PPV

En la **sección 5.1** (Mena *et al.*, 2006) se observó que cuando GFPVP2 es expresada en células de insecto, a las 48 hpi esta proteína forma nucleocápsides de 50 nm de diámetro aglomeradas en el citoplasma, pero cuando es coexpresada con VP6, no se observa la formación de túbulos de VP6, y en cambio se encuentran estructuras correspondientes a la 2/6 PPV en el citoplasma celular. Para entender este proceso, ahora se analizó el desensamblaje y ensamblaje de la 2/6 PPV mediante anisotropía de fluorescencia y dispersión de luz.

Los experimentos de desensamblaje de 2/6 PPV se llevaron a concentraciones de 1 nM (49.5 $\mu\text{g/mL}$). La 2/6 PPV fue caracterizada mediante HPLC-GP y microscopía electrónica (**Figura 5.16**).

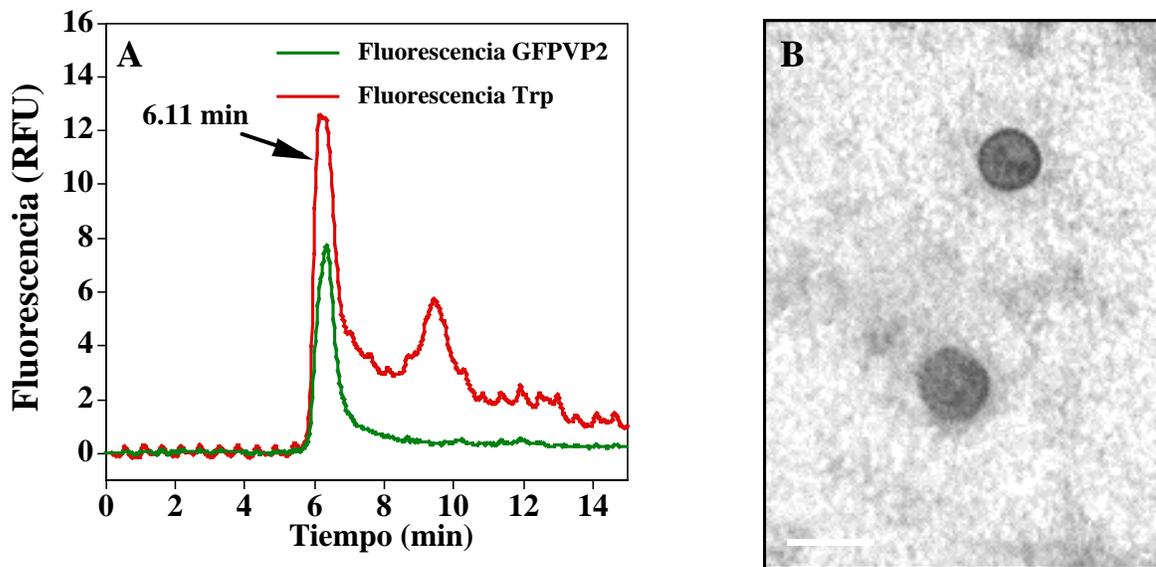


Figura 5.16. Caracterización de la 2/6 PPV empleada en los experimentos de desensamblaje **A.** Cromatograma de la 2/6 PPV. **B.** Micrografía electrónica de la 2/6 PPV.

El enfoque utilizado en este estudio fue similar al empleado para el desensamblaje de VP6. Inicialmente se evaluaron diferentes concentraciones de Ca^{++} para desensamblar la VP6 acoplada a la 2/6 PPV mediante anisotropía de fluorescencia, pero se observó un incremento en la señal, lo que indicaría que las

partículas estaban aumentando en tamaño. Como el ensamblaje de VP6 no es posible a 10 mM de calcio, el aumento de tamaño podría deberse a la agregación de la partícula 2 PPV que es producida al desensamblarse la 2/6 PPV. Diferentes autores han reportado que durante la producción de 2 PPV, las nucleocápsides se agregan y que es necesario añadir surfactantes para su solubilización (Labbe *et al.*, 1991; Mena *et al.*; 2006).

Para evitar esta agregación durante las reacciones de desensamblaje se estudió la adición de Triton X100. En la **Figura 5.17** se observa que sin la adición de Triton X100, la 2 PPV se agrega, mientras que una concentración de Triton X100 de 0.3% fue suficiente para evitar la agregación.

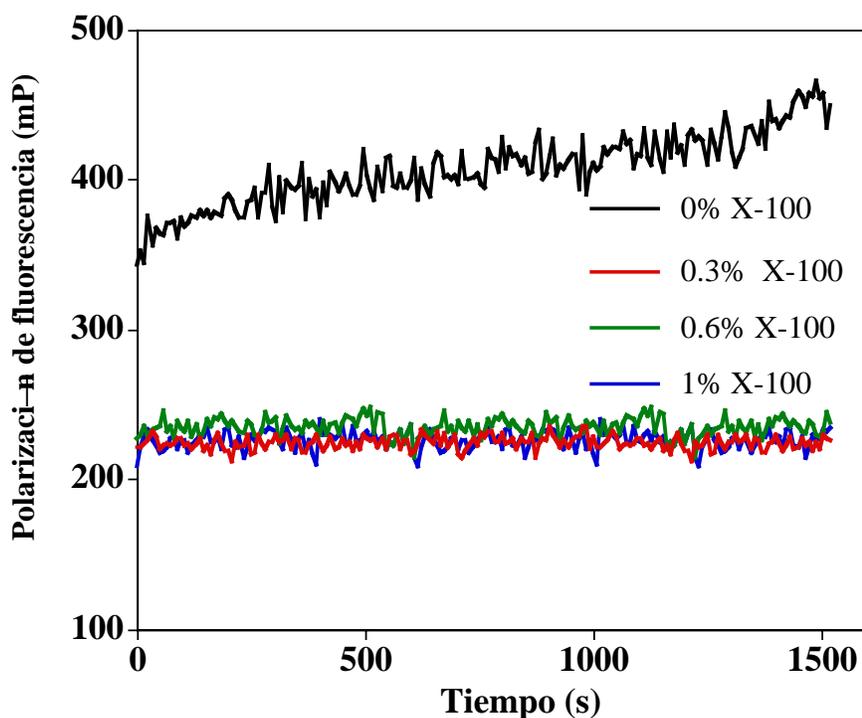


Figura 5.17. Evaluación de la agregación de la 2 PPV (1 nM) mediante anisotropía de fluorescencia.

Entonces las reacciones de desensamblaje se hicieron en un *buffer* que contenía 2/6 PPV (1 nM), Triton X100 (0.3%) y se le adicionó cierto volumen de solución de calcio 1 M para una concentración final de Ca^{++} de 10 mM. Las reacciones fueron monitoreadas por dispersión de luz y el producto final por HPLC-GP. En la **Figura**

5.18 se pueden observar las cinéticas de desensamblaje de la 2/6 PPV. Se evaluaron concentraciones menores de Ca^{++} , pero no hubo reacción en esas condiciones.

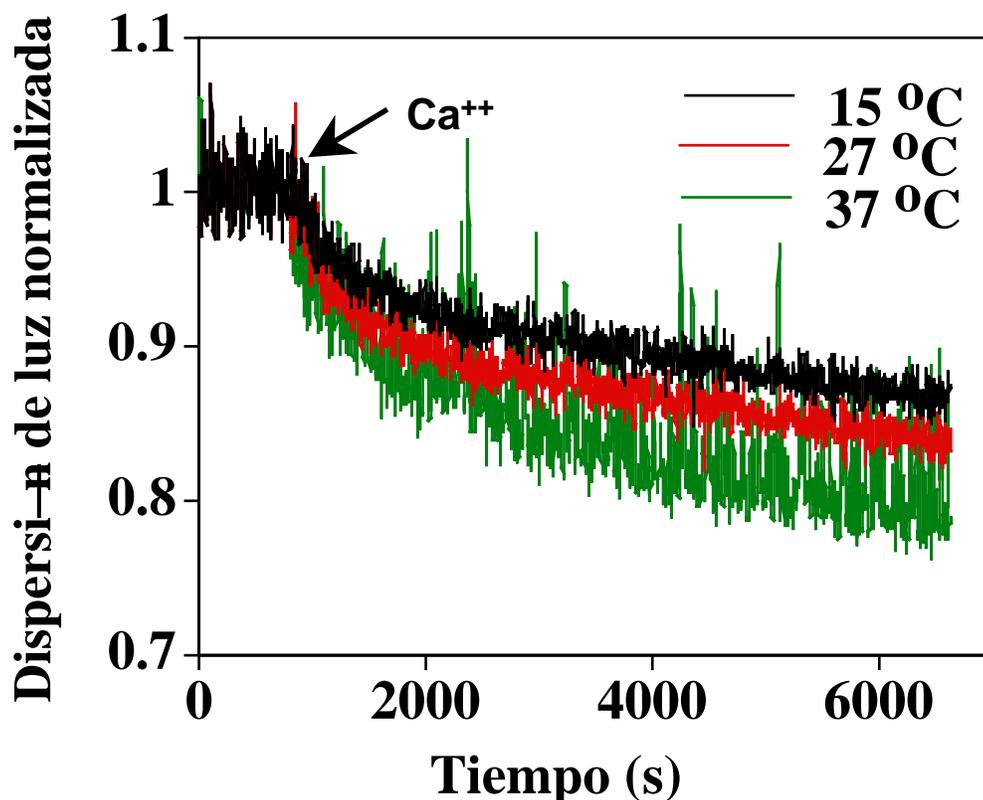


Figura 5.18. Cinéticas de desensamblaje de 2/6 PPV (1 nM) a diferentes temperaturas.

Las cinéticas de desensamblaje de PPV tuvieron un decaimiento exponencial similar al observado en el desensamblaje de túbulos, aunque la disminución de la señal de dispersión de luz sólo fue de 16% en comparación con la disminución de 40% en el ensamblaje de VP6 (**Figura 5.18**). Es probable que esto sea porque el producto final es una mezcla de 2 PPV y monómeros de VP6, no solamente VP6 como en el caso del desensamblaje de los túbulos.

Cuando se analizó el producto de reacción se observó que sí hubo desensamblaje de la estructura 2/6 PPV en 2 PPV y VP6, ya que hubo una disminución en la absorbancia del pico a los 6.01 min que corresponde a la PPV y una aparición de un pico a los 10.1 min que corresponde al tiempo de exclusión de los monómeros

de VP6 (**Figura 5.19**). Por otro lado, el pico detectado por fluorescencia de GFP permaneció a los 6.01 min, correspondiente a la 2 PPV.

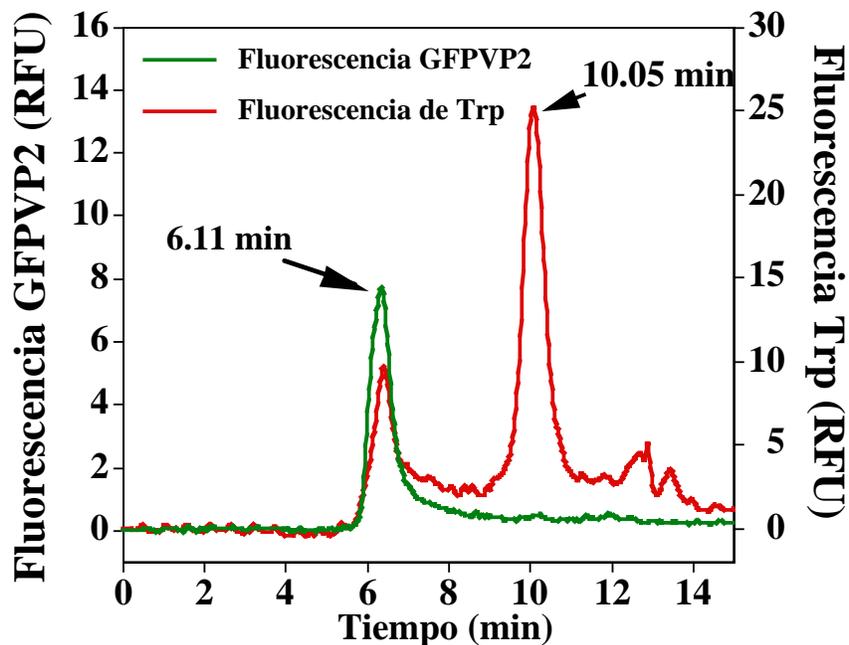


Figura 5.19. Análisis del producto de reacción del desensamblaje de 2/6 PPV mediante HPLC-GP.

El modelo de desensamblaje en dos etapas (**Ecuación 5.1**) fue aplicado para el desensamblaje de 2/6 PPV para calcular las velocidades de reacción y dio resultados adecuados. Similar a los resultados obtenidos en el desensamblaje de VP6, k_1 fue un orden de magnitud mayor que k_2 . Al analizar el efecto de la temperatura en la velocidad de reacción se observó un incremento de 234% para k_1 en el rango de 288°K a 310°K (**Tabla 5.7**), mientras que k_2 aumentó en un orden de magnitud. Este efecto se observa más claramente en la magnitud de ΔG de reacción, en la primera etapa (k_1) fue de -9.44 kcal/mol (± 0.5 kcal/mol), mientras que para la segunda etapa (k_2) fue -13.8 kcal/mol (± 0.9 kcal/mol).

Tabla 5.7 Parámetros cinéticos del desensamblaje de 2/6 PPV (1 nM).

CaCl ₂ (mM)	Temperatura (°C)	k ₁ (s ⁻¹)	k ₂ (s ⁻²)	ΔG° etapa 1 (kcal/mol)	ΔG° etapa 2 (kcal/mol)
10	15	2.3*10 ³	7.1*10 ⁵	-9.4	-13.8
	27	4.1*10 ³	1.1*10 ⁴		
	37	7.7*10 ³	4.1*10 ⁴		

El reensamblaje de 2/6 PPV se realizó mediante la mezcla de nucleocápsides (2 PPV, 1 nM) y VP6 monomérica. El *buffer* de reacción contenía nucleocápsides 2 PPV (1 nM, 14.4 µg/mL), Tritón X100 (0.3%), EGTA (11 mM) y se le adicionó VP6 monomérica a diferentes relaciones estequiométricas con respecto a la 2 PPV. Una mol de 2/6 PPV (1 nM en este estudio) contiene una mol de 2 PPV (1 nM en este estudio) o sea 120 moles de VP2 (120 nM en este estudio) y 780 moles de VP6, por lo que la relación estequiométrica teórica es 6.5 moles de VP6/mol de VP2 (780 moles de VP6/120 moles de VP2). Por lo tanto, para el ensamblaje se usaron concentraciones de VP6 de 780 nM, 1.5 µM y 10 µM, para obtener relaciones estequiométricas de 6.5, 12.5 y 83, respectivamente. Cabe resaltar que 10 µM de VP6 y 1 nM de 2 PPV (120 nM de VP2) corresponde a 12 veces más de la relación teórica (6.5). En la **Figura 5.20** se pueden observar las cinéticas de ensamblaje. El ensamblaje a 780 nM tuvo una fase *lag* aproximadamente de 350 s, pero después el ensamblaje comenzó aunque solo hubo un incremento de 20% en la señal de dispersión de luz. Cuando la concentración de VP6 aumentó, también aumentó la velocidad de reacción y no se presentó la fase lag. El máximo de señal alcanzado fue 95% a 500 s después de la adición de VP6. Sorprendentemente estas cinéticas tienen un crecimiento exponencial de primer orden, o sea que no se observaron las dos etapas que se presentaron en el desensamblaje de túbulos y de 2/6 PPV. El modelo empleado para describir esta cinética fue $y = y_0 + Ae^{-t \cdot k}$ donde y_0 es el punto inicial; t es el tiempo; A es la amplitud; k_1 es la velocidad de reacción. En la **Figura 5.21** se observa el efecto de la concentración en la velocidad de reacción.

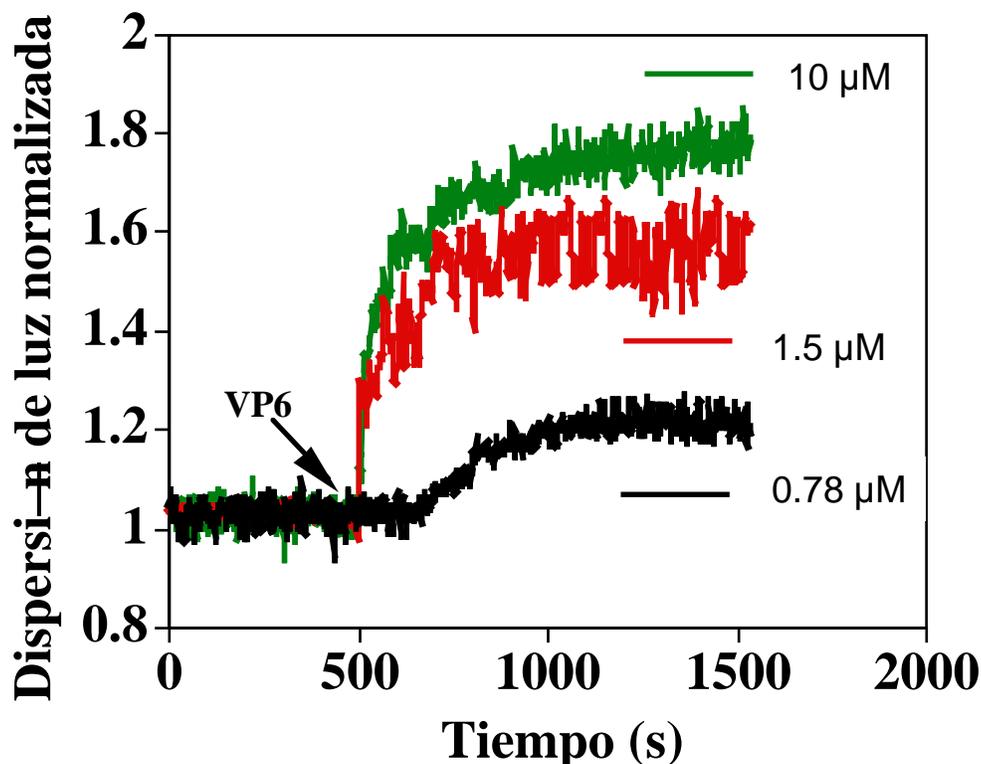


Figura 5.20. Cinéticas de ensamblaje de 2/6 PPV a concentración de 2 PPV de 1 nM y diferentes concentraciones de VP6 a 27°C

Las velocidades de reacción del ensamblaje de 2/6 PPV fueron un orden de magnitud mayores que las velocidades de desensamblaje de túbulos y de 2/6 PPV (**Tabla 5.8**). Si se observan las cinéticas de ensamblaje a 1.5 μM y 10 μM en los primeros instantes de la reacción, se deduce que tienen un comportamiento similar que es independiente de la concentración, lo que indicaría un reacción de orden cero. Esto implicaría la ausencia de la fase de nucleación debido a la presencia de la 2 PPV y no a la alta concentración de VP6, puesto que a concentraciones similares el ensamblaje de VP6 en túbulos no fue tan rápido. Esto corroboraría la hipótesis de que VP2 modula el ensamblaje de la cápside viral, mediante una fuerte interacción entre los residuos que interactúan entre VP2 y VP6. Además, es importante resaltar que la diferencia en la velocidad del ensamblaje de 2/6 PPV ($k_1=1.1 \cdot 10^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la velocidad de ensamblaje de los túbulos de VP6 ($k_2=6.9 \cdot 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) es de dos ordenes de magnitud. Este resultado explicaría porqué cuando se coexpresan las dos proteínas en la misma célula no se observan túbulos de VP6,

ya que la proteína VP6 se ensamblara con las nucleocápsides, y sólo hasta el agotamiento de la GFPVP2, VP6 podrá ensamblarse en túbulos.

Tabla 5.8. Velocidades de reacción de ensamblaje de 2/6 PPV a diferentes concentraciones de VP6 a 27°C

VP6 (μM)	k_1 (s^{-1})	K_1 Desv. Est. (s^{-2})
0.78	$4.8 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^4$
1.5	$8.9 \cdot 10^3$	$4.8 \cdot 10^4$
10	$1.1 \cdot 10^2$	$8.6 \cdot 10^3$

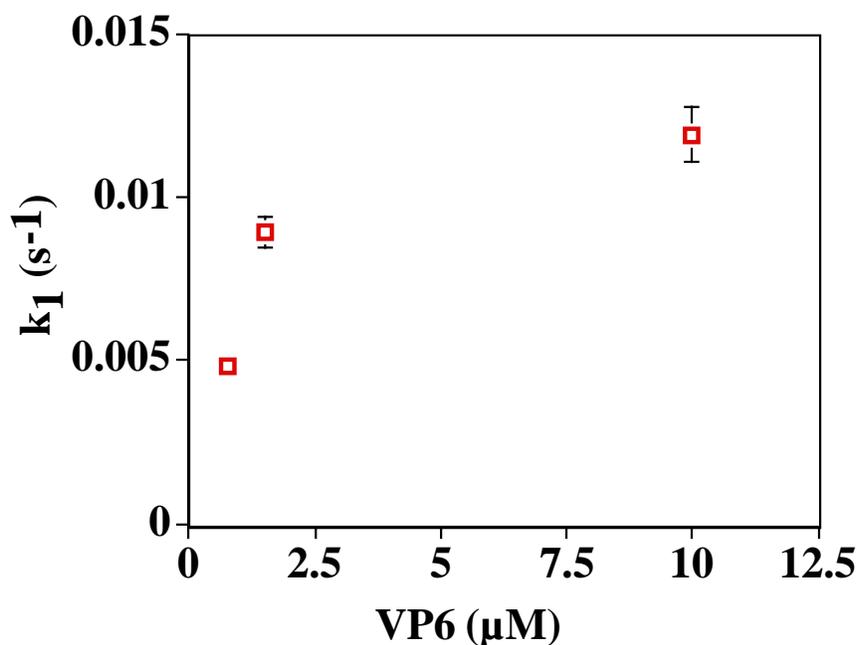


Figura 5.21. Velocidades de ensamblaje de 2/6 a diferentes concentraciones de VP6.

Cabe resaltar que la relación estequiométrica VP6/VP2 (83 mol VP6/mol VP2) que tuvo la mayor velocidad de ensamblaje fue muy superior a la relación estequiométrica teórica que tienen VP6 y VP2 en la cápside (6.5 mol VP6/mol VP2). La necesidad de un exceso de VP6 para que suceda el ensamblaje de la 2/6 PPV es determinante para la producción de 2/6 PPV. Esta condición se debe satisfacer al momento de producir las proteínas estructurales para lograr el ensamblaje y producción de 2/6 PPV. Estos resultados concuerdan con lo

observado en el ciclo viral de rotavirus en células de mamífero su huésped natural, donde se observó que hay un exceso de VP6 y VP7 con respecto a la cantidad de proteína necesaria para ensamblarse con la VP2 presente (Urquidi *et al.*, 1981).

A manera de conclusión, la **Figura 5.22** propone un modelo para el ensamblaje de la 2/6 PPV, a partir de los resultados obtenidos *in vitro* e *in vivo*.

Modelo de ensamblaje de VP6 y 2/6 PPV

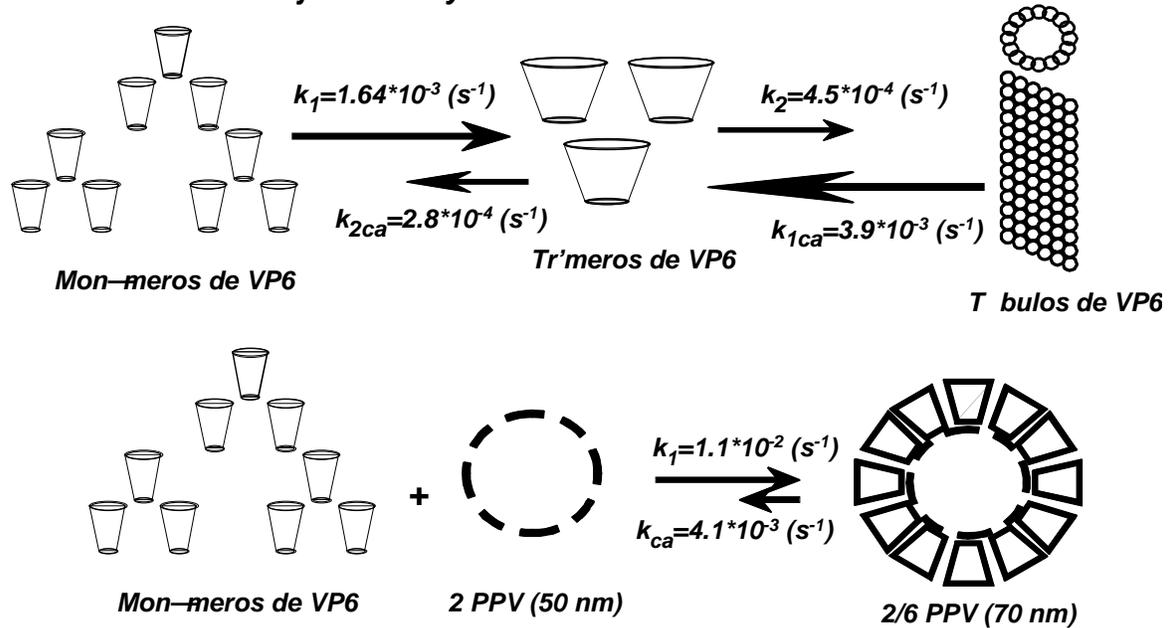


Figura 5.22. Modelo propuesto para el ensamblaje de 2/6 PPV expresada en el sistema CI-BV.

5.7. Estudio cinético de producción de las proteínas estructurales GFPVP2, VP6 y 2/6 PPV a diferentes MDI y relaciones de MDI de los baculovirus *bacGFPVP2* y *bacVP6*

5.7.1 Producción de GFPVP2 a diferentes MDI

Cultivos de células *High Five*TM fueron infectados con *bacGFPVP2* a MDI de 0.1, 1, 5, 10 y 20 ufp/célula. En la **Figura 5.23** se observa la cinética de crecimiento celular a diferentes MDI.

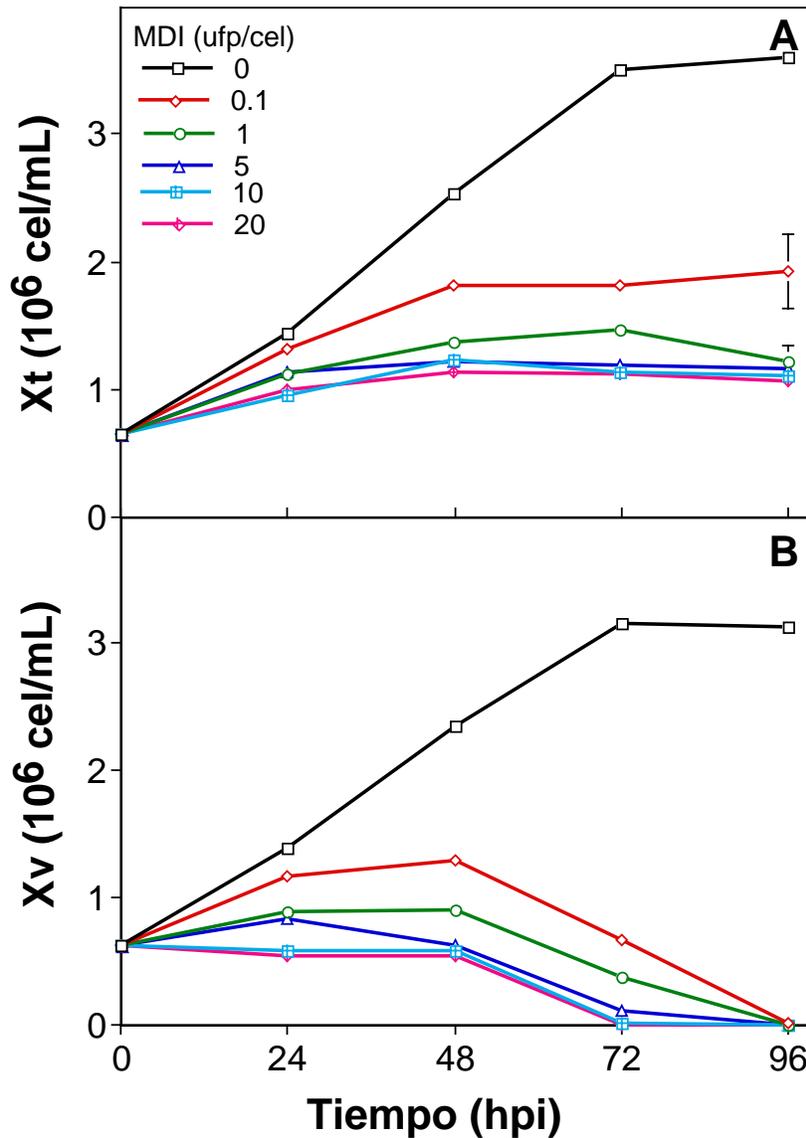


Figura 5.23. Cinética de crecimiento de células *High Five*TM infectadas con *bacGFPVP2* a diferentes MDI. **A.** Células totales. **B.** Células viables.

La concentración celular total se incrementó en todas las MDI durante las primeras 24 hpi, pero el número de células viables sólo se incrementó a MDI de 0.1 ufp/cel. No existió aumento en el número de células viables a ninguna MDI después de 24 hpi, y además, entre las 48 y 72 hpi la viabilidad celular disminuyó drásticamente (**Figura 5.23. B**). Con los resultados de la dinámica poblacional obtenidos en la sección 5.4, fue posible analizar la fracción de la población celular que expresó la proteína GFPVP2 durante la cinética de producción (multiplicando el porcentaje de infección por la concentración total). Estos resultados muestran que a MDI de 0.1 ufp/cel sólo una pequeña fracción de la población está expresando GFPVP2, pero ésta se incrementó a valores mayores a las 48 hpi, en contraste con el resto de las MDI (**Figura 5.24**). Este dato es muy relevante, ya que sugiere que es posible utilizar la infección secundaria como mecanismo para maximizar la expresión de la proteína. Si se infecta a MDI bajas se da tiempo a que las células se dupliquen y no exista un daño citopático pronunciado que sucede a MDI altas. A las 48 hpi existe cantidad suficiente de baculovirus (producido en la infección primaria) para que las células no infectadas inicialmente, lo sean a MDI altas.

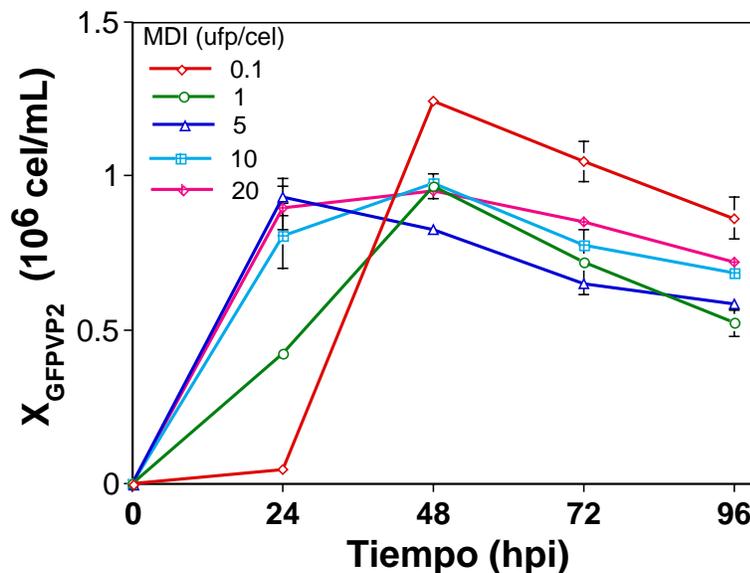


Figura 5.24. Cinética de la población celular que expresó GFPVP2 a diferentes MDI de bacGFPVP2.

A MDI mayores de 5 ufp/cel, la fracción de la población que expresó GFPVP2 fue similar a partir de las 24 hpi. Esto implica que realmente la utilización de MDI mayores de 5 ufp/cel sería ineficiente si lo deseado es incrementar la población que expresa GFPVP2.

Con respecto a la producción de GFPVP2, en la **Figura 5.25** se observa la cinética de producción a diferentes MDI. Las mayores concentraciones de GFPVP2 se alcanzaron a MDI de 0.1 y 1 ufp/cel (3900 y 3500 ng/mL, respectivamente). A MDI de 0.1 ufp/cel esta concentración se alcanzó a las 72 hpi, mientras que en los otros cultivos se alcanzó a las 48 hpi. Posterior al momento que se alcanzó la máxima concentración de GFPVP2 hubo una drástica disminución en la señal de fluorescencia, probablemente debido a actividad proteolítica. Analizando la cinética de producción de GFPVP2, se observa que la utilización de MDI mayores de 5 ufp/cel no representa tampoco un incremento en la concentración de proteína.

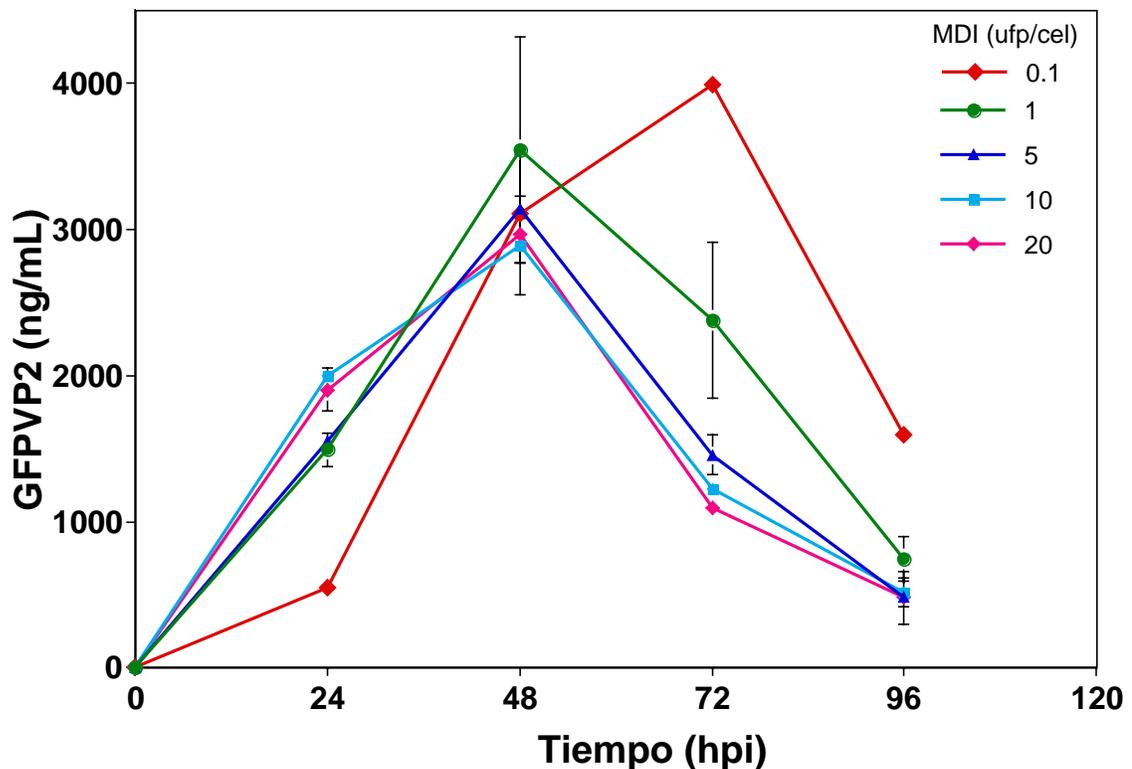


Figura 5.25. Cinética de producción GFPVP2 a diferentes MDI.

5.7.2. Producción de VP6 a diferentes MDI

Cultivos de células *High Five*TM fueron infectados con bacVP6 a MDI de 0.1, 1, 5, 10 y 20 ufp/cel. En la **Figura 5.26** se observa la cinética de crecimiento a diferentes MDI. El comportamiento de la población de células viables y totales fue similar. Las células no alcanzaron a duplicarse a ninguna de las MDI empleadas, y en contraste, con la infección de bacGFPVP2, el número de células totales disminuyó con respecto al tiempo de cultivo. Esto indica que hubo lisis celular debido a la producción de la proteína VP6.

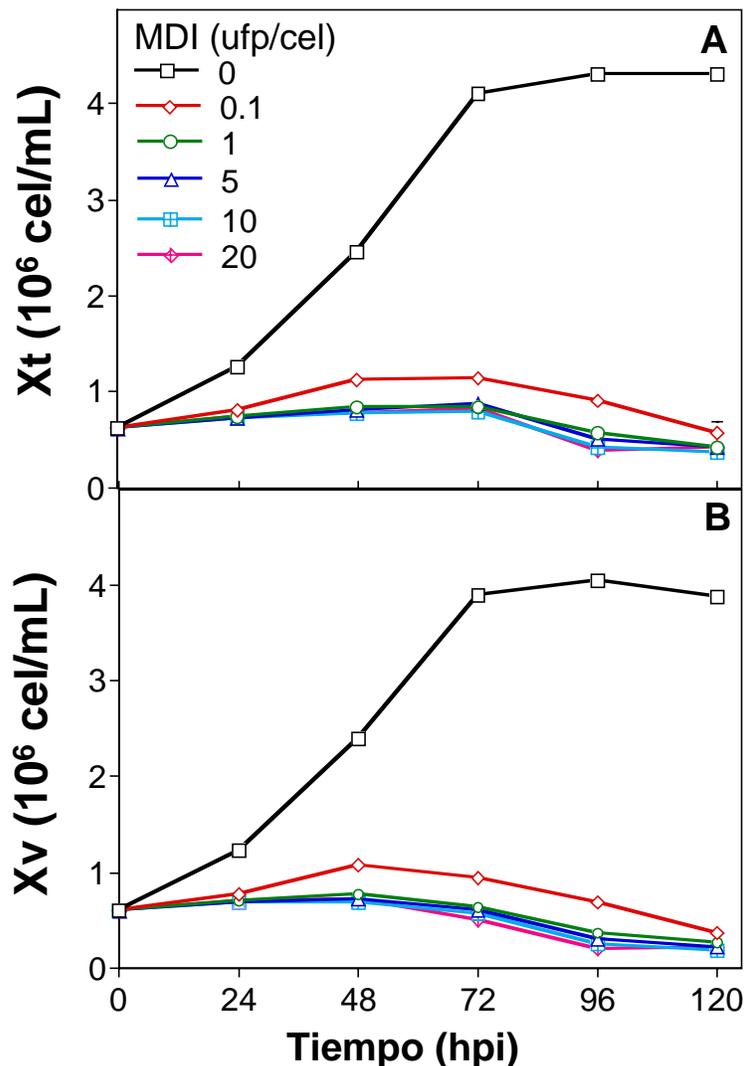


Figura 5.26. Cinética de producción GFPVP2 a diferentes MDI. **A.** Células totales. **B.** Células viables.

En la **Sección 5.1** (Mena *et al.*, 2006) se observó que cuando se expresó VP6 en el sistema de CI-BV ésta se ensambló en túbulos en el citoplasma celular. Debido probablemente a que la sobre-expresión de VP6 en forma tubular comprometa la integridad de la membrana celular, y por ende la lisis celular. Al analizar la población que está expresando VP6 (**Figura 5.27**), se observa un comportamiento similar a GFPVP2. A MDI 0.1 a las 24 hpi, solamente una fracción de la población está infectada y a las 48 hpi hay un aumento significativo. A MDI mayores de 5, no existió una diferencia significativa entre las 24 y 48 hpi. El análisis no se realizó a tiempos mayores por dificultad técnica debido a la fragilidad celular.

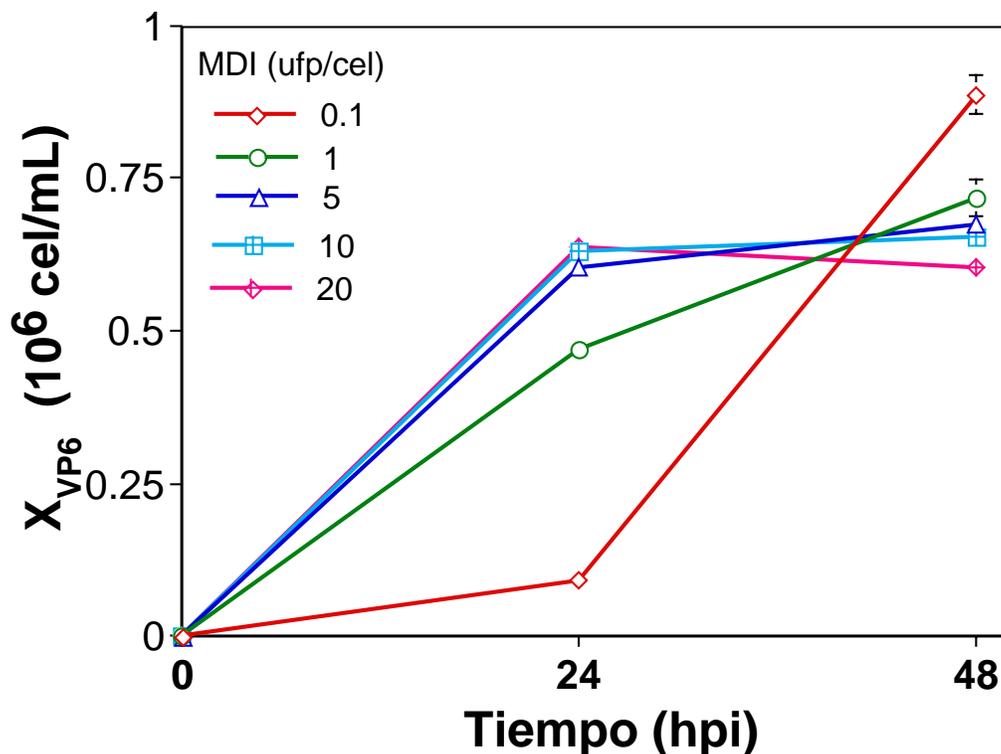


Figura 5.27. Cinética de la población celular que expresó VP6 a diferentes MDI de bacVP6.

Para el análisis de la producción de VP6 es necesario tener en cuenta que la proteína va siendo liberada debido a la lisis celular, conforme transcurre el tiempo de cultivo. Por lo tanto, se analizó la concentración de VP6 en *pellet* y sobrenadante. En la **Figura 5.28** se observa la cinética de producción de

proteína a las diferentes MDI. VP6 se encontró principalmente en el *pellet* celular durante las primeras 72 hpi. A MDI 5 ufp/cel se alcanzó la máxima concentración de VP6 (57,000 ng/mL) a las 48 hpi, y a las 72 hpi se alcanzó la concentración máxima a MDI 1 ufp/cel (116,000 ng/mL) en comparación con las otras MDI. En lo que respecta a MDI 0.1 ufp/cel, la producción de VP6 se prolonga hasta las 96 hpi (100,000 ng/mL).

Las MDI de 5, 10 y 20 ufp/cel tuvieron producciones menores con respecto a MDI bajas. En el sobrenadante, se observó que la liberación de la VP6 sucedió a partir de las 72 hpi, instante que coincide con la disminución de la concentración intracelular. Analizando la producción total de VP6, a MDI bajas (0.1 y 1 ufp/cel) se alcanzó la mayor concentración de VP6 (195,000 y 196,000 ng/mL, respectivamente). En comparación con otras proteínas recombinantes, la concentración de VP6 obtenida con células *High Five*TM está dentro del rango esperado. Por ejemplo, Estrada *et al.* (2005), reportaron que la producción máxima de alcalina fosfatasa (secretada) con células *High Five*TM fue entre 150-250 µg/mL.

Comparando las concentraciones de GFPVP2 y VP6 alcanzadas a diferentes MDI, se puede concluir que la producción de GFPVP2 es el paso limitante en el proceso ya que se obtuvieron en menor cantidad. Ya que en la mayoría de los casos a las 48 hpi fue el punto más alto en la concentración de GFPVP2, es necesario al menos tener la concentración estequiométrica necesaria de VP6 en este instante para el ensamblaje de la 2/6 PPV (2.41 ng VP6/ng GFPVP2; 9,600 ng VP6/mL para 4,000 ng de GFPVP2/mL) (Ver **Sección 5.5**). Esta concentración se alcanza con cualquier MDI de VP6 empleada, pero desde el punto de vista de producción a gran escala el uso de altas MDI no es viable. Por lo tanto MDI de 0.1 o 1 ufp/cel pueden satisfacer esta concentración (10,900 y 21,800 ng/mL). Además, desde el punto de vista de la población que expresa las proteínas, es posible usar el efecto de la infección secundaria para favorecer la producción y ensamblaje de la 2/6 PPV.

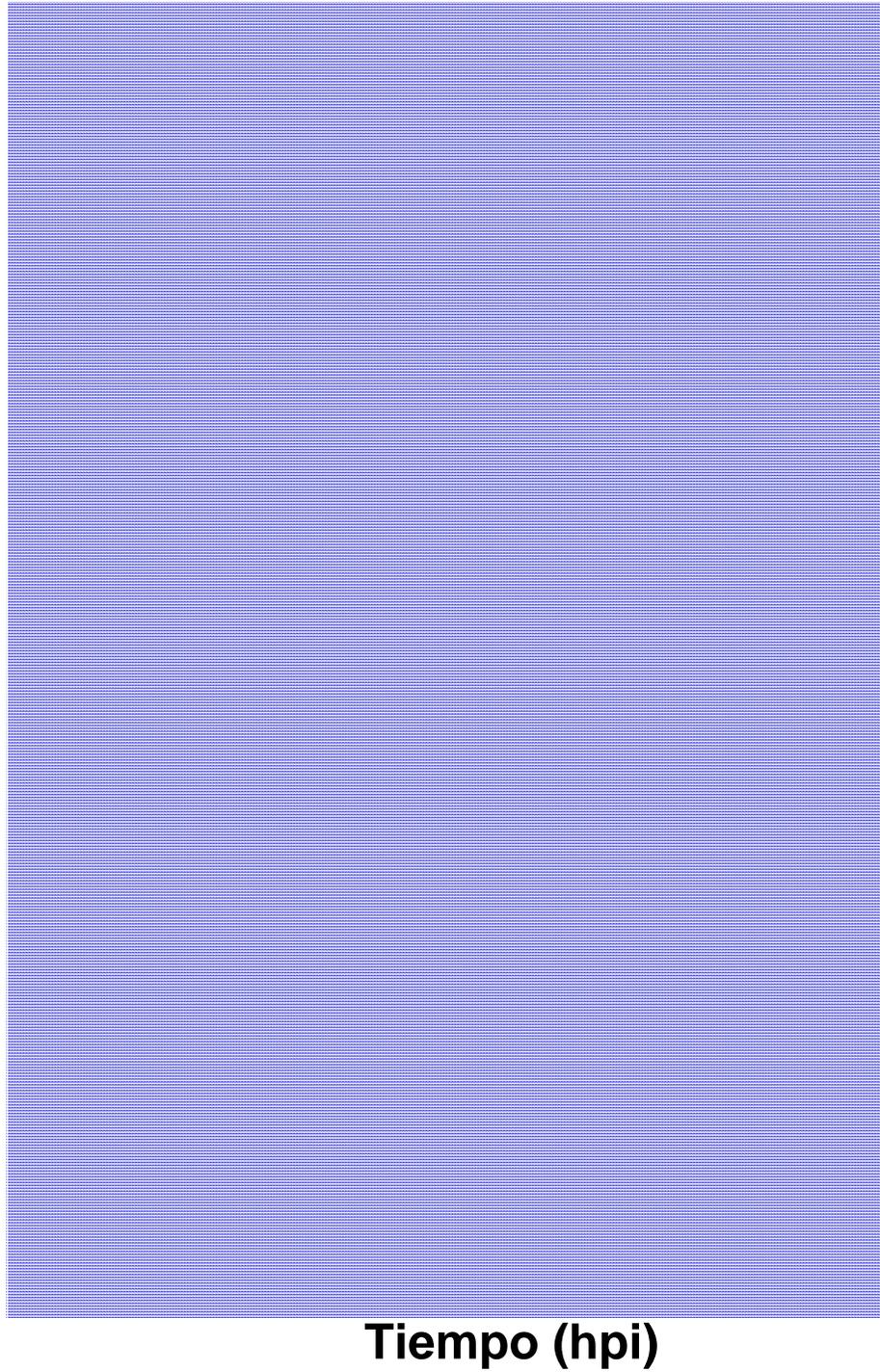


Figura 5.28. Cinética de producción de VP6 a diferentes MDI.

5.7.3. Producción de 2/6 PPV mediante la coinfección con bacGFPVP2 y bacVP6 a diferentes MDI

En las secciones anteriores se analizó la producción independiente de las proteínas estructurales de la 2/6 PPV. En esta sección se evaluó el uso de diferentes MDI de los baculovirus en la producción de PPV. Con los resultados del análisis de la dinámica poblacional (**Sección 5.6**) y la producción de proteína se propuso el uso de las MDI listadas en la **Tabla 5.9** para la producción de 2/6 PPV.

Tabla 5.9. Combinación de MDI propuestas para la producción de 2/6 PPV.

MDI VP6	MDI GFPVP2
0.1 ufp/célula	0.1, 1 y 5 ufp/célula
1 ufp/célula	0.1, 1 y 5 ufp/célula

En la **Figura 5.29** se muestran las cinéticas de crecimiento de las células a diferentes combinaciones de MDI. Entre las MDI de VP6 usadas (0.1 y 1 ufp/cel) no se observó una diferencia significativa en el número de células totales. Además, esta concentración no disminuyó con respecto al tiempo, lo que indica que no hubo desintegración celular significativa. En cuanto a células viables, al incrementar la MDI de bacGFPVP2, el comportamiento fue muy similar al observado en las infecciones sólo con bacGFPVP2 (**Figura 5.29 C y D**).

Respecto a la producción de las proteínas estructurales, en la **Figura 5.30** se puede observar la cinética de producción de GFPVP2 (se analizó la concentración total de GFPVP2 que incluye proteína ensamblada y no ensamblada). La producción de GFPVP2 disminuyó aproximadamente entre 30 y 55%, en comparación con la misma MDI en cultivos no co-infectados. Además, esta disminución fue más notoria con la MDI de bacVP6 de 1 ufp/cel. El tiempo al que se alcanzó la concentración máxima de GFPVP2 se prolongó hasta las 72 hpi en los cultivos co-infectados. Es de resaltar que no se observó la degradación proteolítica característica después de las 72 hpi en los cultivos no

co-infectados. En las coinfecciones a MDI de bacVP6 0.1 ufp/cel las concentraciones de GFPVP2 más altas fueron a MDI de 0.1 y 1 ufp/cel de bacGFPVP2. Este resultado es similar al observado en infecciones sencillas (aunque no se alcanzaron los mismos niveles de expresión).

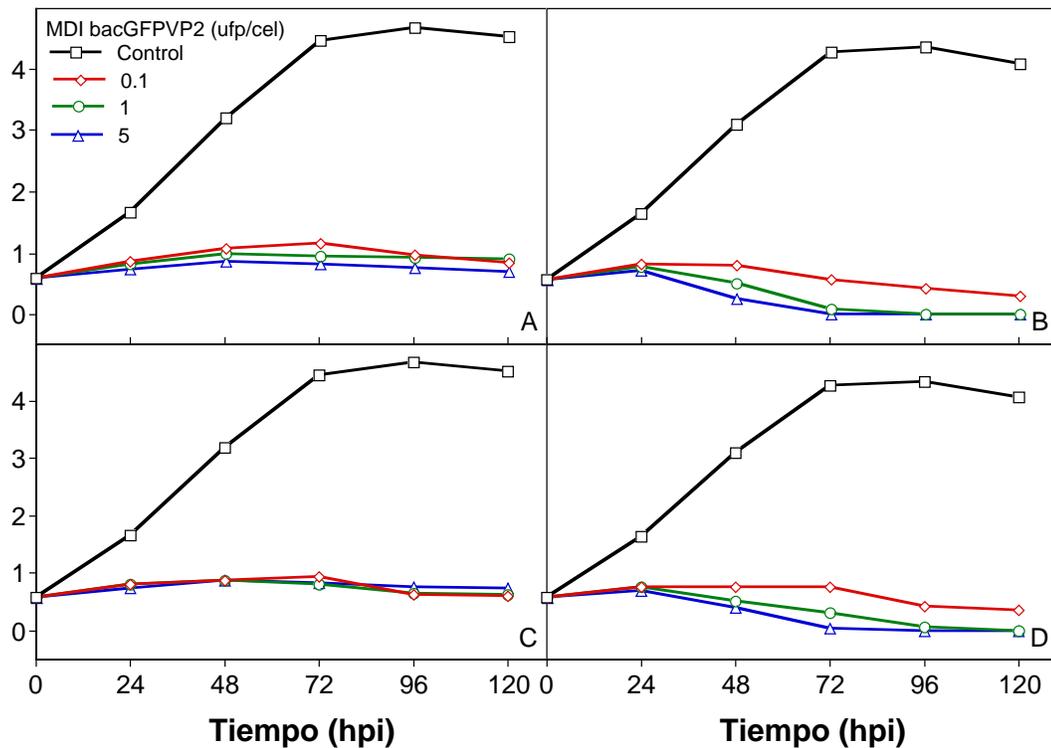


Figura 5.29. Cinética de crecimiento a diferentes MDI de bacVP6 (0.1 y 1 ufp/cel) y bacGFPVP2 (0.1, 1 y 5 ufp/cel). A. Células totales a MDI bacVP6 0.1 ufp/cel. B. Células viables a MDI bacVP6 0.1 ufp/cel. C. Células totales a MDI bacVP6 1 ufp/cel. D. Células viables a MDI bacVP6 1 ufp/cel. Control significa cultivos sin infectar.

Con respecto a VP6, se cuantificó la proteína presente en el *pellet* y el sobrenadante (**Figura 5.31**). La producción máxima de VP6 también disminuyó con respecto a las infecciones sencillas. Esta disminución fue del 48% y 23% para MDI de bacVP6 de 0.1 y 1 ufp/cel, respectivamente. A MDI de 0.1 de bacVP6 se observó una relación inversamente proporcional entre la MDI de bacGFPVP2 y la concentración de VP6 alcanzada. A las 48 hpi, cualquier MDI de bacVP6 0.1 y 1 ufp/cel cumplieron con la concentración mínima necesaria para satisfacer la relación estequiométrica (2.41 ng VP6/ng GFPVP2), aunque a MDI de 1 ufp/cel de bacVP6, la relación VP6/GFPVP2 alcanzada fue

extremadamente alta (23 ng VP6/ng GFPVP2) en comparación con la estequiometría de rotavirus. En general la relación VP6/GFPVP2 a las 48 hpi fue mayor a 2.89 ng/ng (bacVP6 0.1, bacGFPVP2 1).

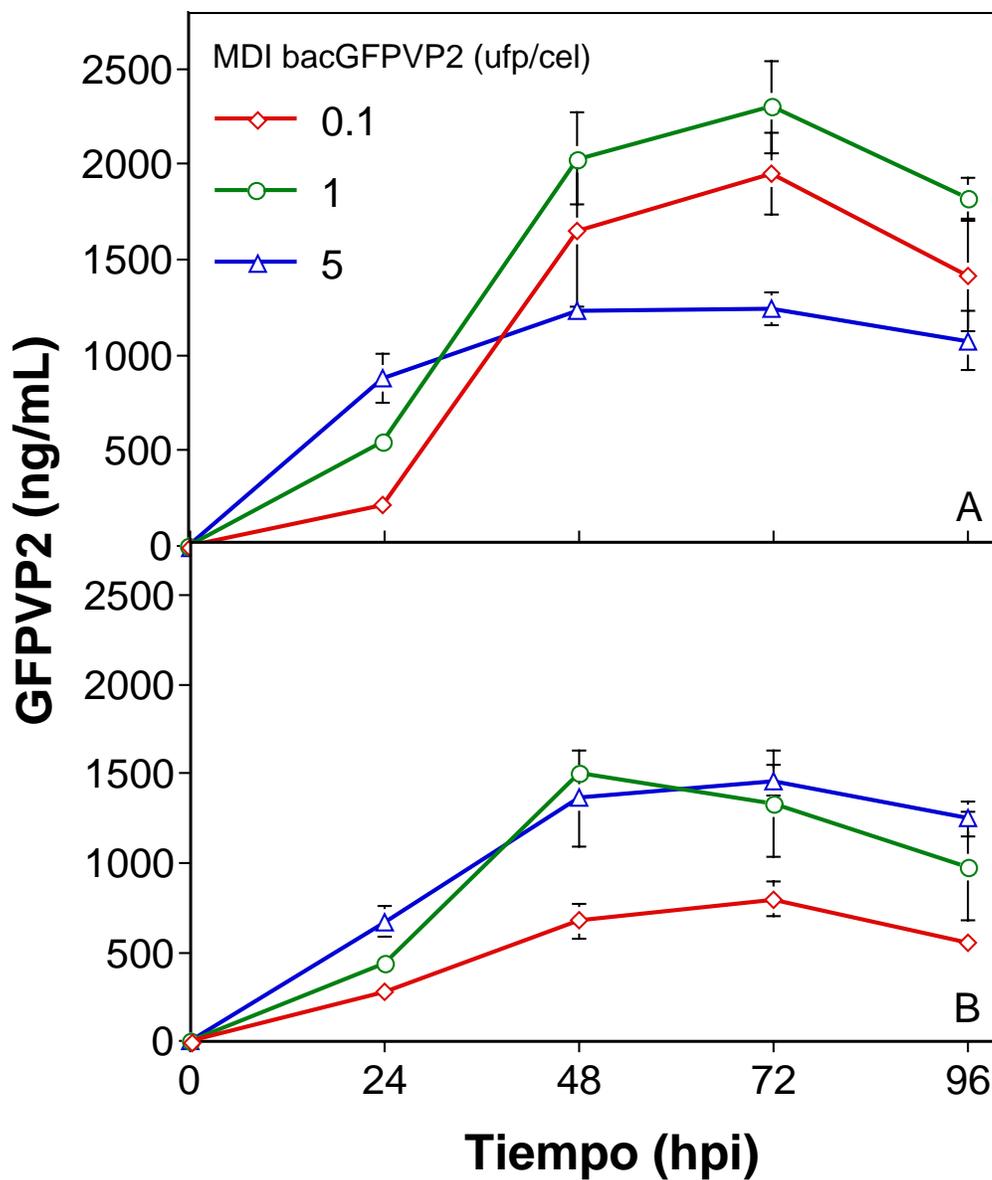


Figura 5.3
Cinética de producción de GFPVP2 a diferentes MDI de bacVP6 (0.1 y 1 ufp/cel) y bacGFPVP2

(0.1, 1 y 5 ufp/cel). A. bacVP6 0.1 ufp/cel. B. bacVP6 1 ufp/cel.

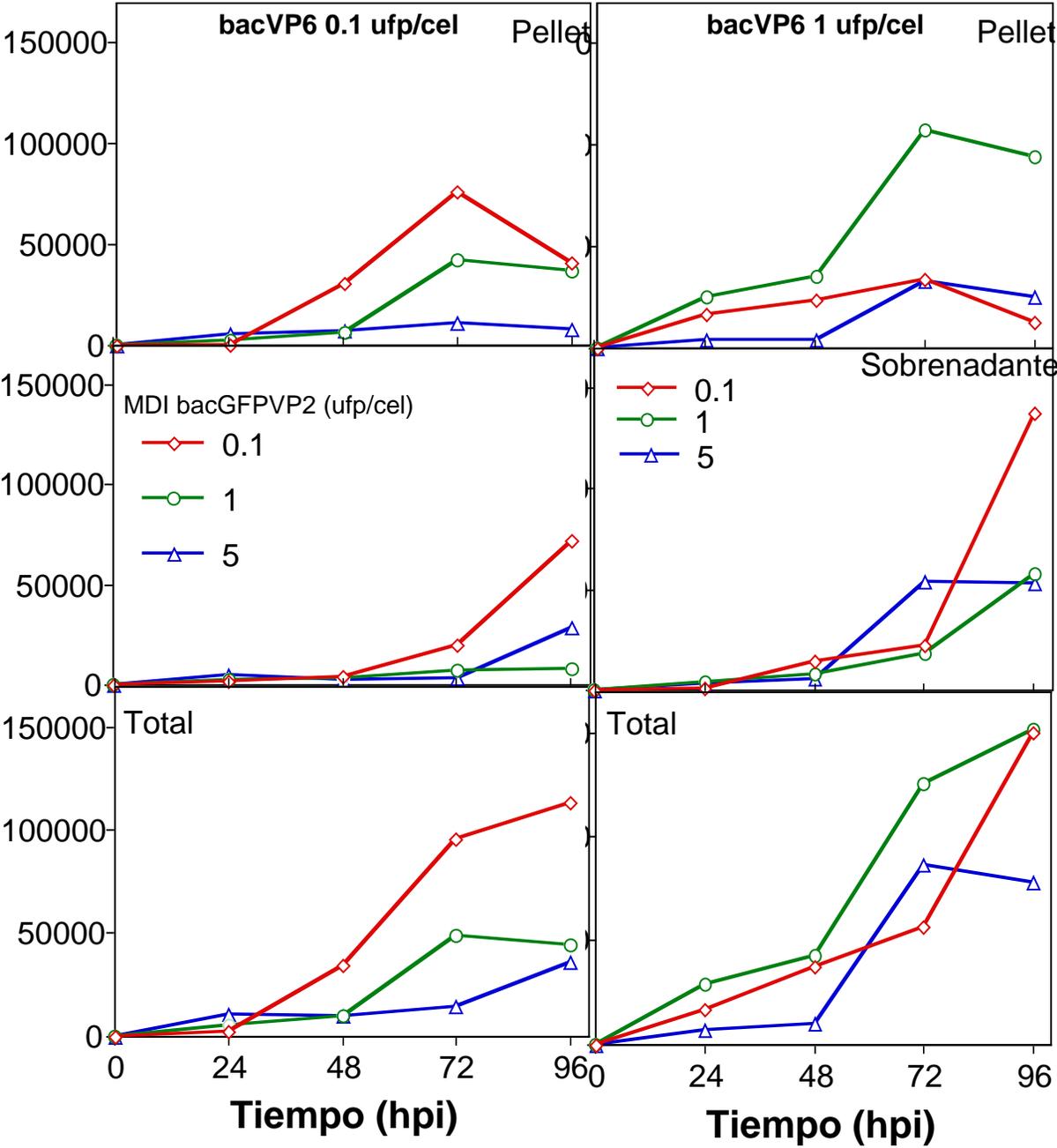


Figura 5.31. Cinética de producción de VP6 a MDI de bacVP6 0.1 y 1 ufp/cel a diferentes MDI de bacGFPVP2 (0.1, 1 y 5 ufp/cel).

Los resultados de la producción de 2/6 PPV están graficados en la **Figura 5.32**. La concentración de 2/6 PPV fue cuantificada en *pellet* celular y sobrenadante. La concentración máxima alcanzada fue de 3,125 ng/mL de 2/6 PPV a las 96 hpi. Sorpresivamente la combinación de MDI utilizada que resultó en la máxima concentración de 2/6 PPV fue de 0.1 ufp/cel de bacVP6 y 0.1 ufp/cel de bacGFPVP2. Cabe resaltar que a MDI de bacVP6 de 0.1 ufp/cel se produjo menor cantidad de VP6 con respecto a MDI de 1 ufp/cel de bacVP6 (**Figura 5.31**), aunque se produjo mayor cantidad de GFPVP2. Este resultado confirma que el ensamblaje y producción de 2/6 PPV está determinado por la concentración de GFPVP2. Los tiempos a los cuales se alcanzó la concentración máxima de GFPVP2 y 2/6 PPV no coinciden (48 hpi y 96 hpi respectivamente), lo cual indicaría que aunque no hay más producción de GFPVP2 después de las 48 hpi, las nucleocápsides remanentes se están ensamblando con la VP6 que está disponible en el citoplasma. Además, a estas combinaciones de MDI, la fracción de PPV en el sobrenadante fue baja, probablemente debido a que no existió una lisis celular que permitiera la liberación de las PPV, como en el caso reportado por Mena *et al.* (2005) para la relación bacVP6/bacGFPVP2 1/5. A esta relación las PPV empiezan a ser liberadas a las 48 hpi.

Para determinar la eficiencia del ensamblaje se realizó el cálculo de GFPVP2 ensamblada sobre GFPVP2 total producida. En la **Figura 5.33** se observa que en la mayoría de los experimentos, la eficiencia estuvo por encima del 20%. En el caso de mayor producción de 2/6 PPV, la eficiencia fue de 63.3%. La MDI de bacVP6 de 1 ufp/cel resultó en un proceso más eficiente para el ensamblaje de 2/6 PPV, pero la baja concentración de GFPVP2 fue limitante al momento de producir más 2/6 PPV, en comparación con la MDI de bacVP6 0.1.

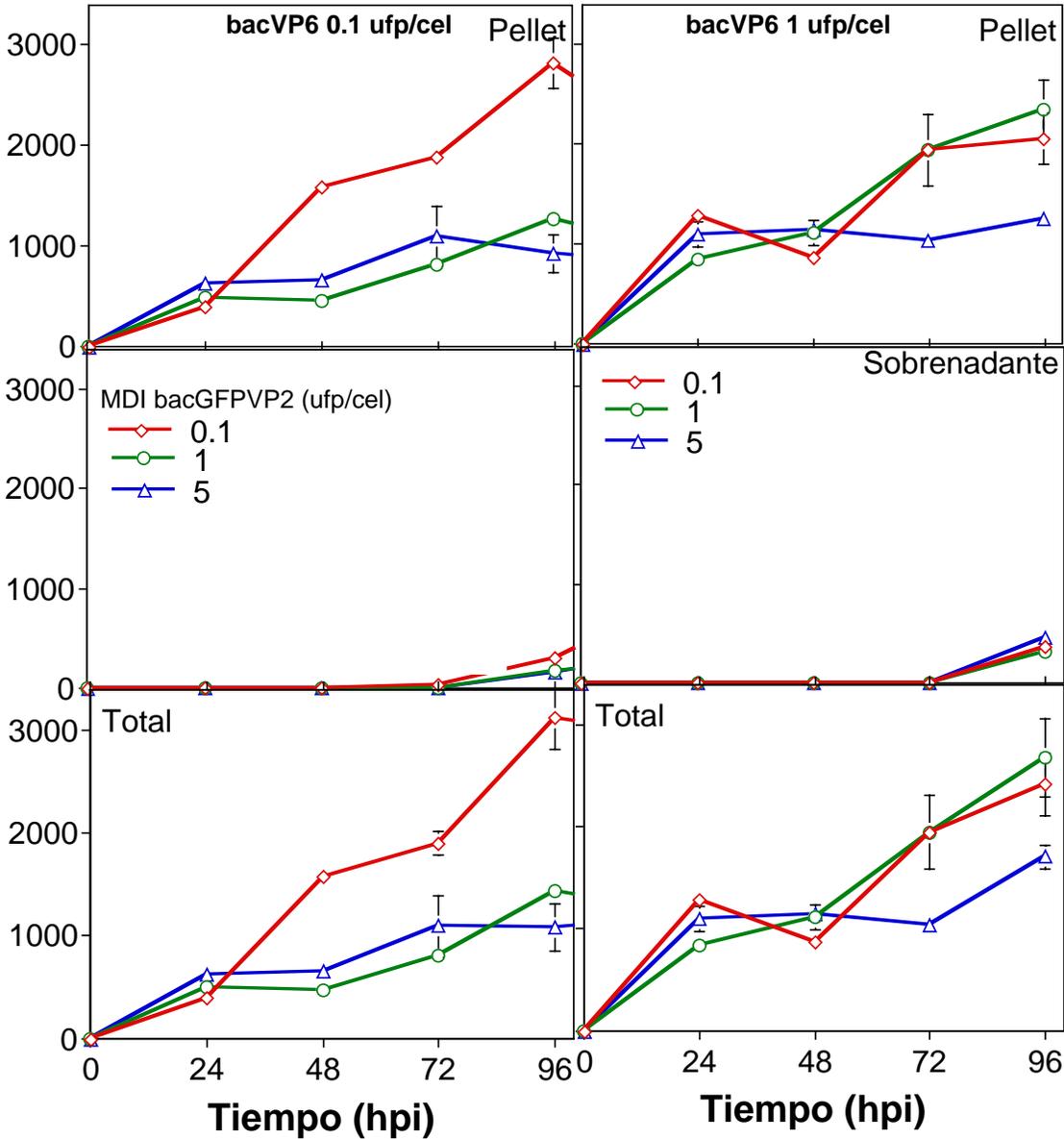


Figura 5.32. Cinética de producción de 2/6 PPV a MDI de bacVP6 0.1 y 1 ufp/cel a diferentes MDI bacGFPVP2 (0.1, 1 y 5 ufp/cel).

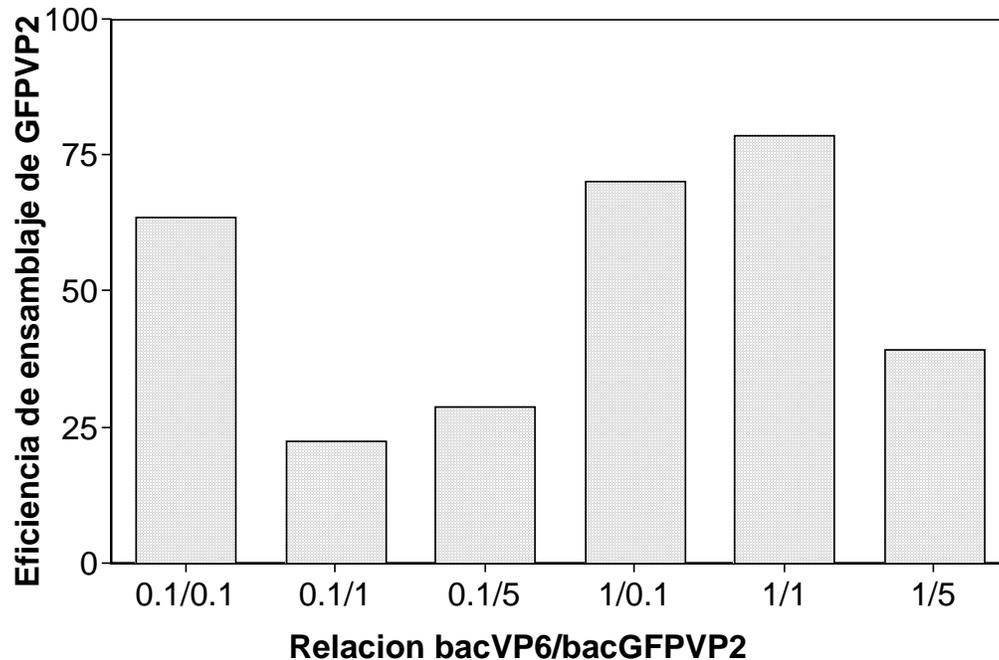


Figura 5.33. Eficiencia de ensamblaje de GFPVP2 a las diferentes combinaciones de MDI utilizadas.

Al realizar el análisis entre relación estequiométrica y producción de 2/6 PPV se observa que las combinaciones de MDI que dan mayores relaciones molares VP6/VP2 son a su vez las de mayor producción de 2/6 PPV (**Figura 5.34**). Además, la tendencia indicaría que a partir de relaciones molares VP6/VP2 mayores de 200 no hay incremento significativo en la concentración de 2/6 PPV. Este resultado concuerda con lo observado en los experimentos *in vitro* que indican que es necesario un exceso de VP6 con respecto a VP2 mayor que la relación estequiométrica teórica (6.5 mol VP6/mol VP2) para maximizar el ensamblaje. A su vez, las mismas combinaciones de MDI que produjeron mayor concentración de 2/6 PPV son las que presentaron altas eficiencias de ensamblaje (**Figura 5.35**), lo que confirma la relación directamente proporcional entre ensamblaje y producción de cápsides virales.

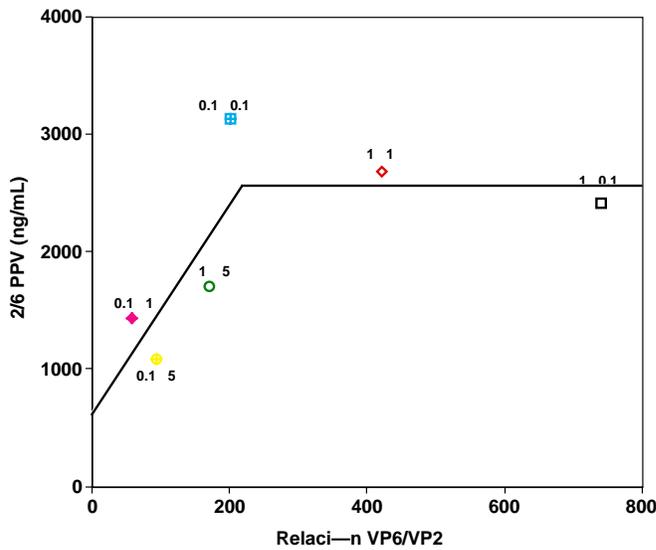


Figura 5.34. Efecto de la relación estequiométrica molar VP6/VP2 en la concentración de 2/6 PPV

Este es el primer estudio cinético de la producción de PPV, en el que se analiza tanto la producción de las proteínas estructurales como la producción de PPV. Las concentraciones alcanzadas de PPV en este estudio son similares a las reportadas por Jiang *et al.* (1998), de entre 4000 a 6000 ng/mL a 120 hpi.

En conclusión, la mejor estrategia de producción de PPV de rotavirus es el uso de MDI de infección de 0.1 o 1 ufp/cel de cada baculovirus para obtener los mayores rendimientos, aunque la mayor eficiencia de ensamblaje de GFPVP2 logró a MDI 1 ufp/cel de cada baculovirus.

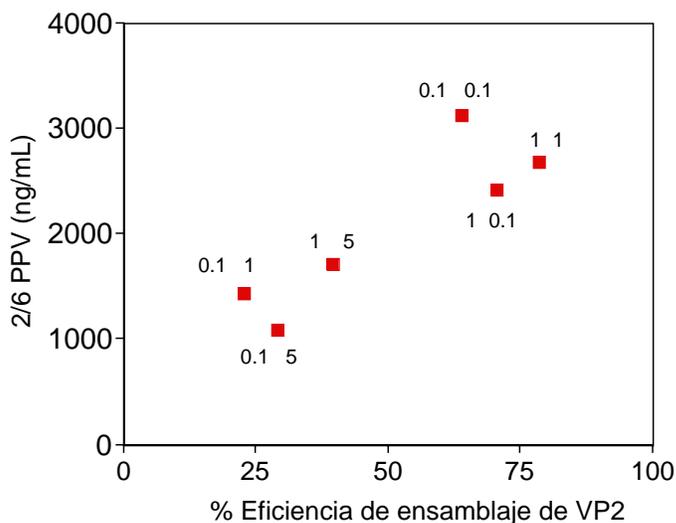


Figura 5.35. Relación entre la eficiencia de ensamblaje y la concentración de 2/6 PPV.

6. CONCLUSIONES

La proteína GFPVP2, cuando se expresa en células de insecto, tiene un patrón de localización difuso a las 24 hpi, pero a las 48 hpi, forma grupos de nucleocápsides altamente ordenadas en el citoplasma celular.

La proteína VP6, cuando se expresa en células de insecto, se localiza inicialmente difundida en el citoplasma (24 h.p.i.), pero después de las 48 h.p.i. se polimeriza en túbulos, debido a las condiciones ambientales intracelulares y al aumento de la concentración de proteína, de acuerdo con los resultados obtenidos en el ensamblaje *in vitro*.

La coexpresión de las proteínas GFPVP2 y VP6 altera el patrón de localización de ambas proteínas (VP6 y GFPVP2), VP6 pasa de una estructura fibrilar a la formación de gránulos dispersos en la célula. Ambas proteínas colocalizaron en células que las expresan simultáneamente, formando la estructura 2/6 PPV en el citoplasma celular.

El método cromatográfico de cuantificación de 2/6 PPV demostró ser rápido, reproducible y altamente sensible.

El método de purificación de 2/6 PPV que acopló las etapas de fases acuosas y permeación en gel permitieron alcanzar rendimientos de 63% y 58%, a partir de sobrenadante y *pellet* celular respectivamente. Además, el proceso desarrollado a nivel preparativo es fácilmente escalable.

El método de purificación de túbulos de VP6 permitió obtener un producto con alta pureza (98%) con un rendimiento de 20%, estos túbulos pueden ser usados en estudios de nanotecnología como templados para la formación de nanoestructuras.

El desensamblaje de VP6 (túbulos) mediante CaCl_2 es un proceso de dos etapas, cada una de primer orden. La primera etapa es de túbulo a trímero y la segunda etapa es desde trímero a monómero.

El auto-ensamblaje de VP6 es un proceso dependiente de la concentración, y al igual que el desensamblaje, incluye dos etapas. En este proceso la etapa de trimerización es un orden de magnitud más rápida que la formación de los túbulos.

El desensamblaje de 2/6 PPV es un proceso del mismo orden de magnitud (con respecto a su velocidad) que el desensamblaje de los túbulos.

A diferencia del ensamblaje de VP6, el ensamblaje de 2/6 PPV es un proceso de primer orden y dos ordenes de magnitud más veloz.

Desde el punto de vista cinético, la diferencia en las velocidades de reacción del ensamblaje de VP6 en túbulos con respecto a su ensamblaje en 2/6 PPV, favorece la formación de la PPV tanto *in vitro* como *in vivo* sobre la formación de los túbulos.

En infecciones independientes la población celular que expresó GFPVP2 o VP6 siguió el modelo probabilístico de Poisson.

En la expresión de GFPVP2 y VP6 a MDI bajas (0.1 y 1 ufp/cel) la infección secundaria es eficiente, lográndose niveles entre 80% y 90% de población celular de expresando la proteína recombinante a las 48 hpi.

La población celular en coinfecciones que expresen ambas proteínas no puede ser predicha mediante la distribución de Poisson o mediante una extrapolación directa de los resultados de infecciones sencillas.

En los cultivos coinfectados, la infección secundaria de bacVP6 interfiere con la expresión de bacGFPVP2, dando como resultado una alta proporción de células que expresaron VP6.

En infecciones independientes de bacGFPVP2 la máxima concentración alcanzada fue de 3900 ng/mL a MDI de 0.1 ufp/cel a las 72 hpi.

A MDI mayores o iguales a 5 ufp/cel de bacGFPVP2 en infecciones independientes no se observó un incremento significativo en la concentración de GFPVP2 en comparación con MDI de 0.1 o 1 ufp/cel. En contraste, la proteína VP6 se expresó a concentraciones 50 veces mayores en comparación con GFPVP2 a las mismas MDI.

La estrategia de coinfección a bajas MDI puede ser muy útil dada la alta eficiencia de la infección secundaria a las 48 hpi. De esta manera se puede reducir el volumen de virus a usar, así como lograr un mayor número de células que coexpresan aGFPVP2 y VP6.

En cultivos coinfectados la máximas concentraciones de GFPVP2 se obtuvo a MDI de bacVP6 0.1 ufp/cel y bacGFPVP2 0.1 y 1 ufp/cel, mientras que la concentración de VP6 a cualquier MDI siempre estuvo por encima de la relación estequiométrica, por lo tanto no hubo limitación en el ensamblaje por parte de VP6.

La concentración máxima de 2/6 PPV (3125 ng/mL) se alcanzó a MDI bajas de bacGFPVP2 y bacVP6 a las 96 hpi (0.1 ufp/cel de bacVP6 y 0.1 ufp/cel de bacGFPVP2), con una eficiencia de ensamblaje del 63%. Aunque la mayor eficiencia de ensamblaje de GFPVP2 ocurrió a MDI bacVP6 de 1 ufp/cel y bacGPVP2 de 1 ufp/cel, la concentración de 2/6 PPV fue de 2354 ng/mL.

El paso limitante en la producción de 2/6 PPV es la concentración de 2 PPV, debido a que siempre hubo un exceso significativo de VP6 para el ensamblaje de

2/6 PPV.

Para maximizar el ensamblaje y producción de 2/6 PPV es necesario tener un exceso molar de VP6 con respecto a la relación estequiométrica teórica , tanto *in vivo* como *in vitro* (30 y 10 veces, respectivamente).

La estrategia propuesta para la producción de 2/6 PPV es el uso de MDI bajas e iguales de ambos baculovirus (0.1 o 1), puesto que estas MDI maximizan el ensamblaje y producción.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Benavides J., Mena J.A., Cisneros M., Palomares L.A., Ramirez O.T. Rito-Palomares M. 2006. Rotavirus-like particles primary recovery from insect cells in aqueous two-phase systems. *Journal of chromatography B*. 842: 48-57.
- Bertolotti-Ciarlet A., White L., Chen R., Prasa V., Estes M. 2002. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *Journal of Virology*. 76 (8): 4044-4055.
- Ceres P., Zlotnick A. 2002. Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis b virus capsids. *Biochemistry* 41: 11525-11531
- Ciarlet M., Crawford S., Barone C., Bertolotti-Ciarlet A., Ramig R. F., Estes M., Conner M. 1998. Subunit rotavirus vaccine administered parenterally to rabbits induces active protective immunity. *Journal of Virology*. 72 (11): 9223-9246.
- Charpilienne A., Nejmeddine M., Berois M., Parez N., Neumann E., Hewat E., Trugnan G., Cohen, J. 2001. Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (31): 29361-29367.
- Chen X. S., Casini G., Harrison S. C., Garcea R. L. 2001. Papillomavirus capsid protein expression in *E. coli*: Purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *Journal of Molecular Biology*. 307: 173-182.
- Conner M., Ramig R. 1997. *Viral Enteric Diseases. Viral Pathogenesis*. Lippincott-Raven Publisher. Fields B., Knipe D., Howley P., (Eds). Lippincott-Raven Publisher; Philadelphia. pp 45-62.
- Dee K.U., Shuler M.L. 1997. Optimization of an assay for baculovirus titer and design of regimens for the synchronous infection of insect cells. *Biotechnology Progress.*, 13: 14-24
- Endres D., Zlotnick A. 2002. Model-based analysis of assembly kinetics for virus capsids or other spherical polymers. *Biophysical Journal*. 83 (2):1217-1230.
- Estes M. 1996. Rotavirus and their replication. *Fields Virology*. 3 Edition;. Fields B., Knipe D., Howley P., (Eds). Lippincott-Raven Publisher; Philadelphia. pp: 1625-1655
- Estes M., Cohen J. 1989 Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews* 53, 4: 410-449.

- Estrada-Mondaca, S., Delgado-Bustos, L.A., Ramirez, O.T. 2005. Mannosamine supplementation extends N-acetylglucosaminylation of r-human-SeAP produced in *Trichoplusia* in insect cell culture. *Biotechnol Appl Biochem.* 42: 25-34.
- Fischlechner M., Donath E. 2007. Viruses as building blocks for materials and devices. *Angewandte Chemie International Edition.* 46: 3184-3193
- Fromantin C., Jamot B., Cohen J., Piroth L., Pothier P., Kohli E. 2001 Rotavirus 2/6 virus-like particles administered intranasally in mice, with or without mucosal adjuvants cholera toxin and *E coli* heat-labile toxin, induce a Th1/Th2-like immune response. *Journal of Virology.* 75 (22): 11010-11016.
- Gilbert, J. M., Feng, N., Patton, J. T., Greenberg, H. B. 2001. Rotavirus assembly-interaction of surface protein VP7 with middle layer protein VP6. *Arch. Virol.* 146: 1155-1171.
- Goldman C., Petry H., Frye S., Ast O., Ebitsch S., Jenstsch K., Kaup F., Weber F., Trebst C., Nisslein T., Hunsmann G., Weber T., Luke W. 1999. Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JV virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutics studies. *Journal of Virology.* 73 (5): 4465-4469
- Gruenwald S., Heitz J. 1993. Baculovirus expression vector system: Procedures and methods manual. Second Edition. PharMingen. San Diego. California
- Hu Y., Bentley W. 2001. Effect of MOI ratio on the composition and yield of chimeric infectious bursal disease virus-like particles by baculovirus co-infection: deterministic predictions and experimental results. *Biotechnology and Bioengineering.* 75 (1): 104-118.
- Ishizu K., Watanabe H., Han S., Kanesashi S., Hoque M., Yajima H., Kataoka K., Handa H. 2001. Roles of disulfide linkage and calcium ion –mediated interactions in assembly and disassembly of virus-like particles composed of Simian Virus VP1 capsid protein. *Journal of Virology.* 75 (1): 61-72.
- Jiang B., Barniak V., Smith R., Sharma R., Corsaro B., Hu B., Madore p: 1998. Synthesis of rotavirus-like particles in insect cells: comparative and quantitative analysis. *Biotechnology and Bioengineering.* 60 (3): 369-374.
- Jiang X., Zhong W.M., Farkas T., Huang P.W., Wilton N., Barret E., Fulton D., Morrow R., Matson D.O. 2002. Baculovirus expression and antigenicity characterization of the capsid proteins of three Norwalk-like viruses. *Archives of Virology.* 147: 119-130.
- Kipikian A., Chanock R. 1996. Rotaviruses. *Fields Virology.* 3 Edition;. Fields B., Knipe D., Howley P., (Eds). Lippincott-Raven Publisher; Philadelphia. pp: 1657-1708.

- Labbé M., Charpiliene A., Crawford S., Estes M., Cohen J: 1991. Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *Journal of Virology*. 65 (6): 2946-2952.
- Lawton J.A., Zeng C.Q.Y., Mukherjee S.K., Cohen J., Estes M.K., Prasad B. V. V. 1997. Three-Dimensional Structural Analysis of Recombinant Rotavirus-Like Particles with Intact and Amino-Terminal-Deleted VP2: Implications for the Architecture of the VP2 Capsid Layer. *Journal of Virology*. 71 (10): 7353-7360
- Lepault J., Petitpas I., Erk I., Navaza J., Bigot D., Dona M., Vachette P., Cohen J., Rey F. 2001. Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *The EMBO journal*. 20 (7): 1489-1507
- Li M., Cripe T. P., Estes P. A., Lyon M.K., Rose R.C., Garcea R. L. 1997. Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *E. coli*: Characterization of proteins domains involved in DNA binding and capsid assembly. *Journal of Virology*. 71 (4): 2988-2995.
- Licari P., Bailey J.E. 1991. Factors influencing recombinant protein yields in an insect cell-baculovirus expression system: Multiplicity of infection and intracellular protein degradation. *Biotechnology and Bioengineering*. 37: 238-246.
- Mathieu M., Petitpas I., Navaza J., Lepault J., Kohli E., Pothier P., Prasad B., Cohen J., Rey F. 2001. Atomic structure of the major capsid structure protein rotavirus: implications for the architecture of the virion. *EMBO Journal*. 20 (7) 1485-1497.
- McCarthy M., White W., Palmer-Hill F., Koenig S., Suzich J. 1998. Quantitative disassembly and reassembly of human papillomavirus type 11 viruslike particles in vitro. *Journal of Virology*. 72: 32-41
- Mena J.A., Ramírez O.T., Palomares L.A. 2003. Titration of Non-Occluded Baculovirus Using a Cell Viability Assay. *BioTechniques*. 34: 260-264.
- Mena J.A., 2004. Estudio del ensamblaje de pseudo-partículas virales de rotavirus en el sistema de células de insecto-baculovirus. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mena J.A., Ramírez O.T., Palomares L.A. 2005. Quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography B*. 824: 267-276
- Mena J.A., Ramírez O.T., Palomares L.A. 2006. Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *Journal of Biotechnology*. 122: 443-452.
- Mena J.A., Ramírez O.T., Palomares L.A. 2007. Population kinetics during

simultaneous infection of insect cells with two different recombinant baculoviruses for the production of rotavirus-like particles. *BMC Biotechnology*. Aceptado.

Miller W. 1996. *Insect viruses. Fields Virology*. 3 Edition;. Lippincott-Raven Publisher; Philadelphia.

Noad R., Roy P. 2003. Virus-like particles as immunogens. *TRENDS in Microbiology*. 11 (9): 438-444

O'Neal C., Crawford S., Estes M., Conner M. 1997. Rotavirus like-particles administered mucosally induce protective immunity. *Journal of Virology*. 71 (11): 8707-8717.

O'Really D., Miller L., Luckow V. A. 1994. *Baculovirus expression vector: a laboratory manual*. Ed. Oxford University Press. New York. pp 27-30.

Palkova Z., Adamec T., Liebl D., Stoková J., Forstová J. 2000. Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interactions with cell structures. *FEBS Letters*. 478: 281-289.

Palomares L.A., 1999. Estudio del proceso de producción y ensamblaje de proteínas multiméricas a través del sistema células de insecto-baculovirus. Tesis de Dr. en Ciencias; Universidad Nacional Autónoma de México.

Palomares L.A., López S., Ramírez O. 2002. Strategies for manipulating the relative concentration of recombinant rotavirus structural proteins during simultaneous production by insect cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 78 (6): 635-644.

Palomares L.A., Estrada-Mondaca S., Ramirez O.T. 2006 Principles and applications of the insect cell baculovirus expression vector system. En: *Cell culture technology for pharmaceutical and cellular therapies*. Ozturk S., Hu W.S. (Eds). Marcel-Dekker, New York.

Patton J. T., Spencert E. 2000. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology*. 277: 217-225.

Perez-Vargas J. 2001. Dominios estructurales de la proteína VP6 de rotavirus potencialmente relevantes para la actividad de transcripción viral. Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

Pesavento J.B., Lawton J.A., Mary K. Estes M.K., Prasad B. V. V. 2001. The reversible condensation and expansion of the rotavirus genome. *PNAS*. 98 (4): 1381-1386.

Power J. F., Reid S., Radford K. M., Greenfield P. F., Nielsen L. K. 1994. Modeling and optimization of the baculovirus expression vector system in a batch suspension culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 44 (6): 710-719.

- Prasad B. V. V., Wang, G. J., Clerx, J. P. M., Chiu, W. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199: 269-275.
- Rhiel M., Mitchell-Logean C.M., Murhammer D. W. 1997. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High Five) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering.* 55: 909-920.
- Rose R., Bonnez W., Reicman R., Garcea R. 1993. Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: *in vivo* and *in vitro* assembly of viruslike particles. *Journal of Virology.* 67 (4): 1936-1944.
- Roy P., Mikhailov M., Bishop D. H. L. 1997. Baculovirus multigene expressions vectors and their use for understanding the assembly process of architecturally complex virus particles. *Gene.* 190: 119-129.
- Saldaña S., Esquivel-Guadarrama F., Olivera-Flores J., De Jesús T., Arias N., López S., Arias C., Ruiz-Medrano R., Mason H., Mor T., Richter L., Arntzen C.J., Gómez-Lim M.A., 2006. Production of rotavirus-like particles in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) fruit by expression of capsid proteins vp2 and vp6 and immunological studies. *Viral Immunology.* 19 (1): 42–53
- Shuttleworth G., Eckery D.C., Awram P. 2005. Oral and intraperitoneal immunization with rotavirus 2/6 virus-like particles stimulates a systemic and mucosal immune response in mice. *Arch Virol* 150: 341–349
- Siddiqui M.A., Perry C.M. 2006. Human papillomavirus quadrivalent (types 6, 11,16, 18) recombinant vaccine (Gardasil). *Drugs.* 66 (9):1263-1271
- Smith G. E., Summers M.D., Frase M. J. 1983. Production of human beta interferon in insect cells with a baculovirus expression vector. *Molecular en Cellular Biology.* 3: 2156-2165.
- Takehara K., Ireland D., Bishop D. H. L. 1988. Co-expression of the hepatitis B surface and core antigens using baculovirus multiple expresion vectors. *Journal of General Virology.* 69: 2763-2777.
- Thomas H., Carman W. F. 2000. Hepatitis B vaccine. United States Patent. No. 6,099,840.
- Tleugabulova D., Falcón V., Sewer M., Penton E. 1998. Aggregation of recombinant hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. *Journal of Chromatography A.* 716: 209-219.

- Tleugabulova D., Falcón V., Penton E. 1999. Physico-chemical characterization of recombinant hepatitis B surface antigen by multidimensional approach. *Journal of Chromatography A*. 845: 171-179.
- Tsao E., Mason M., Cacciuttolo M., Bowen S.; 1996. Production of parvovirus B19 vaccine in insect cells co-infected with double baculovirus. *Biotechnology and Bioengineering*. 49:130-138.
- Urabe M. Ding CH. And Cotin R.N. 2002 Insect cells as factory produces Adeno-Associated Virus Type 2 vectors. *Human gene therapy*. 13:1935-1943
- Urquidi J., Novo E., Esparza J.T. 1981. Protein Synthesis in Cells Infected with Bovine Rotavirus. *J. gen. Virol.* 53: 363-369
- Vieira H.L.A., Estevao C., Roldao A., Peixoto C.C., Sousa M.F.Q., Cruz P.E., Carrondo M.J.T., Alves P.M. 2005. Triple layered rotavirus VLP production: Kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production. *Journal of Biotechnology*. 120: 72–82
- Warzecha H., Mason H.S., Lane C., Tryggvesson A., Rybicki E., Williamson A.L., Clements J.D., Rose R.C. 2003. Oral immunogenicity of human papillomavirus-like particles expressed in potato. *Journal of Virology*. 77 (16): 8702–8711
- Wong K.T.K., Peter C. H., Greenfield P. F., Reid S., Nielsen L.K. 1996. Low multiplicity infection of insect cells with recombinant baculovirus: The cell yield concept. *Biotechnology and Bioengineering*. 49: 659-666.
- Zandi R., Schoot P.V.D., Reguera D., Kegel W., Reiss H. 2006. Classical Nucleation Theory of Virus Capsids. *Biophysical Journal*. 90: 1939–1948
- Zeng, C. Q., Estes, M. K., Charpilienne, A., Cohen, J. 1998. The N-terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. *Journal of Virology*. 72 (1): 201-208.
- Zhang W., Carmichael J., Ferguson J., Inglis S., Ashrafian H., Stanley M. 1998. Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in *E. coli*: Denaturation, renaturation, and self assembly of virus-like particles *in vitro*. *Virology*. 243: 423-431.
- Zlotnick A., Johnson J., Wingfield P.W., Stahl S.J., Endres D. 1999. A theoretical model successfully identifies features of hepatitis b virus capsid assembly. *Biochemistry* 38: 14644-14652
- Zlotnick A., Ceres P., Singh S., Johnson J. 2002. A small molecule inhibits and misdirects assembly of hepatitis b virus capsids. *Journal of Virology*. 76 (10): 4848–4854