



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE UNIÓN Y
TRANSPORTE DE CÁPSIDES DE VIRUS
ADENOSOCIADO TIPO 2 EN
CÉLULAS DE MAMIFERO**

Tesis

Que para obtener del grado de Maestro en Ciencias

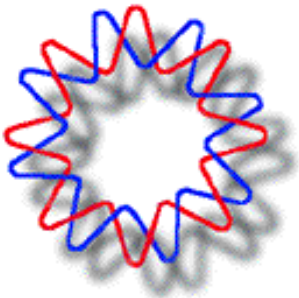
Presenta:

Ricardo Rojas Gómez

Tutora:

Dra. Laura A. Palomares Aguilera

Cuernavaca, Morelos 2009





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 económico de la beca de maestría CONACyT y los proyectos CONACyT 46225-Z, PAPIIT-UNAM-IN224409.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Octavio Tonatiuh por haberme permitido ser parte de su grupo y por todo su apoyo.

A la Dra. Laura A. Palomares por toda su guía, ayuda incondicional y sus sabios consejos. Por haber respetado mis espacios y porque a pesar de las diferencias de cada ser, usted sabe reconocer lo mejor de cada uno para potenciarlo. Muchas gracias Doc.

A Karin Levy, Vanessa Hernández y Ruth Pastor por todo su apoyo logístico, por su amistad y porque su trabajo fue de gran importancia para el feliz término de este trabajo.

A Ruben, Pamela y Álvaro, por ser mi familia en México, por todo su amor, apoyo y por hacerme sentir como en casa.

A mis compañeros y amigos William, Liliana, Rene, Mauricio, Ciutlahuah, Itzcoatl, German, Gheorghe, Jose Eduardo, Nuria, Julio, Antonino, Toño, Ramses, Martha, Lili, Mabel, Adriana, Luis Caspeta, Ricardo, David, Edna, Lilu, Felipe y a todo el club de “Covy”, por haberme acompañado durante este proceso y por todos los gratos momentos.

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

Dra. Rosana Sánchez

Dr. Ernesto Méndez

Dr. Pavel Isa

A los miembros de mi jurado por sus valiosos aportes y comentarios:

Dr. Lorenzo Segovia

Dr. Pavel Isa

Dr. José Luis Reyes

Dr. Miguel Ángel Torres

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM, a Gloria, Toño y Maribel de la unidad de docencia, a la unidad de síntesis y secuenciación de ADN, a la unidad proteómica y a la unidad de microscopia electrónica y confocal del IBT. A la Dra. Alba Lecona de la unidad de microscopia electrónica del Instituto Nacional de Salud Pública.

DEDICATORIA

A toda mi familia por todo su amor, apoyo incondicional y porque sus oraciones me dieron la fortaleza para seguir cada día.

A Viviana por todo su amor y porque a pesar de la distancia fue la única persona que realmente conoció mis aciertos y desaciertos, alegrías y tristezas.

A mis tíos Bitato y Papo por todo su amor y por la motivación que me dieron en vida de venir a México a estudiar. Porque desde el cielo me estuvieron apoyando y acompañando durante estos años.

ÍNDICE

Índice de figuras	vii
Índice de tablas	xi
Nomenclatura	xii
Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	3
Terapia génica y vectores virales	3
Virus adenoasociado tipo 2	4
Proteínas estructurales	6
Baculovirus	12
Sistema de células de insecto-baculovirus (SCI-BV)	13
Parámetros que influyen en la producción de proteínas recombinantes en el SCI-BV	15
Citometría de flujo	17
Hipótesis	19
Objetivos	20
Materiales y métodos	21
Líneas celulares	21
Construcción de baculovirus recombinantes proteínas VPs	21
Construcción de baculovirus recombinantes fusiones EGFP-VPs	24
Ensayo en placa para el aislamiento de placas virales	25
Producción de stocks virales de trabajo.....	26
Análisis de la expresión de proteínas	28
Ensayo en microplaca por el método de Bradford	28
Western blot	29

Espectrometría de masas	29
Producción de Partículas pseudovirales (PPVs) en el SCI-BV	30
Medición del tamaño de las PPVs por dispersión dinámica de la luz	30
Cuantificación de las PPVs por ELISA	31
Microscopía electrónica de transmisión	32
Microscopía de epifluorescencia y confocal	33
Citometría de flujo	34
Resultados	35
Construcción de los vectores de transferencia pFastBac-VPs	35
Producción de baculovirus recombinantes	36
Expresión de las proteínas VP del VAA-2	37
Construcción de las fusiones EGFP-VPs	38
Purificación de las partículas pseudovirales	47
Análisis de las partículas pseudovirales por HPLC.....	50
Producción de las partículas pseudovirales en el SCI-BV	52
Análisis de las partículas pseudovirales por citometría de flujo	63
Cuantificación de las partículas pseudovirales por ELISA	65
Evaluación de la capacidad de unión e internalización de las PPVs por microscopía de epifluorescencia y confocal	67
Evaluación de la capacidad de unión e internalización de las PPVs por citometría de flujo	70
Conclusiones	72
Perspectivas	74
Bibliografía	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Genes y promotores del VAA-2	5
Figura 2.	Cápside del VAA-2	7
Figura 3.	Modelo de infección del VAA-2	9
Figura 4.	Baculovirus	12
Figura 5.	Diagrama del ciclo de replicación del baculovirus silvestre	14
Figura 6.	Distribución de Poisson	16
Figura 7.	Región codificante de las VPs del VAA-2	22
Figura 8.	Esquema de producción de baculovirus recombinantes en el sistema Bac-to-Bac	23
Figura 9.	PCR para verificación del bácmido recombinante	25
Figura 10.	Curva de titulación por ELISA para cuantificar VAA-2	32
Figura 11.	Digestión de los plásmidos pVL-VPs y pFastBac1 (pFB)	35
Figura 12.	Vectores de transferencia pFastBac-VPs	35
Figura 13.	PCR de colonias DH10Bac recombinantes para los genes VPs	36
Figura 14.	Western blot de lisado de células con anticuerpo B1	37
Figura 15.	Western blot de cinéticas de producción proteínas VP.....	39
Figura 16.	Resultados de espectrometría de masas de VP2	40
Figura 17.	PCR para EGFP con oligos mutagénicos	41
Figura 18.	Vector pCR8/GW/TOPO [®] TA	41

Figura 19. Digestión pCR8-EGFP y pFastBac-VPs con <i>BamHI</i>	42
Figura 20. PCR de los plásmidos pFastBac-EGFP-VPs	42
Figura 21. Cultivo de células Sf9 transfectadas con los bácmidos EGFP-VPs	43
Figura 22. Western blot de lisado de células transfectadas con los bácmidos recombinantes para las fusiones EGFP-VPs	44
Figura 23. RT-PCR de células Sf9 infectadas con baculovirus recombinantes para las fusiones EGFP-VPs	45
Figura 24. Western blot de lisado de pellet de células Sf9 infectadas con las placas virales de las fusiones EGFP-VPs	46
Figura 25. Cromatografía de intercambio aniónico	49
Figura 26. Cromatografía de exclusión molecular	49
Figura 27. Western blot con anticuerpo anti-GP64	50
Figura 28. Cromatograma de la curva de calibración para HPLC	51
Figura 29. Perfil cromatográfico de absorbancia de muestras de gradientes de CsCl, usando las columnas Ultrahydrogel 2000 y Ultrahydrogel 500	52
Figura 30. Gradientes de CsCl y Western blot con el anticuerpo B1 de las coinfecciones de células Sf9 con los Bac-VPs	52
Figura 31. Microscopía electrónica de PPVs de la coinfección con VP1, VP2 y VP3	53
Figura 32. Gradiente de CsCl de la coinfección EGFP-VP1, VP2 y VP3 y análisis de las PPVs por dispersión dinámica de la luz	54
Figura 33. Microscopía electrónica de las PPVs de la coinfección con EGF-VP1, VP2 y VP3	55
Figura 34. Espectro de emisión de fluorescencia de las PPVs de la coinfección de EGFP-VP1, VP2 y VP3 y gel teñido con nitrato de plata	55

Figura 35. Gradientes de CsCl de las coinfecciones a MDI de 5:5:5 y 5:1:1 ufp/célula y concentración de proteína total de las bandas recuperadas.....	56
Figura 36. SDS-PAGE teñido con nitrato de plata de las bandas de los gradientes de las coinfecciones con EGFP-VP1, VP2 y VP3 y perfil de fluorescencia de las bandas verdes obtenidas	57
Figura 37. Microscopía electrónica de las PPVs de la coinfección con EGFP-VP1, VP2 y VP3 a una MDI de 5:5:5 ufp/célula	58
Figura 38. Gradiente de CsCl de la coinfección con VP2, VP3 y EGFP-VP3 a una MDI de 5 ufp/célula y microscopía electrónica de la banda recuperada	59
Figura 39. Gradientes de CsCl de las coinfecciones con EGFP-VP2 y con EGFP-VP3 y análisis por dispersión dinámica de la luz de las bandas recuperadas de la coinfección con EGFP-VP3.....	60
Figura 40. SDS-PAGE teñido con plata de las PPVs de las coinfecciones con EGFP-VP2 y con EGFP-VP3	61
Figura 41. Perfil de fluorescencia de las bandas obtenidas de los gradientes de CsCl de las coinfecciones con EGFP-VP2 y EGFP-VP3	61
Figura 42. Microscopía electrónica de las PPVs obtenidas de la coinfección con VP1, EGFP-VP2 y VP3 a una MDI de 5:5:5 ufp/célula	62
Figura 43. Microscopía electrónica de las PPVs obtenidas de la coinfección con VP1, VP2 y EGFP-VP3 a una MDI de 5:5:5 ufp/célula	62
Figura 44. Citometría de flujo de las PPVs con EGFP-VP1 y fluoroesferas de 20, 40 y 100 nm	63
Figura 45. Cuantificación de capsides de las muestras recuperadas de los gradientes de CsCl por ELISA	65
Figura 46. Microscopía de epifluorescencia de células Sf9 coinfectadas con los Bac-EGFP y los Bac-VPs.....	66

Figura 47. Microscopía de epifluorescencia de células HEK293T incubadas con cápsides fusionadas con EGFP-VP1	68
Figura 48. Microscopía confocal de células HEK293T incubadas con 5×10^4 y 5×10^5 cápsides con la fusión EGFP-VP1 por cada célula	69
Figura 49. Microscopía de epifluorescencia de células HEK293T incubadas con PPVs con EGFP-VP1, EGFP-VP2 y EGFP-VP3	69
Figura 50. Evaluación de la unión e internalización de las PPVs marcadas con EGFP en las células HEK293T por citometría de flujo	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Líneas celulares de insecto	15
Tabla 2. Títulos virales de los stocks de trabajo	28
Tabla 3. Anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos y colorantes de ADN utilizados en los ensayos de inmunocitoquímica	33
Tabla 4. Combinaciones de los baculovirus recombinantes usadas para el ensamblaje de PPVs con la fusión de EGFP-VP3	59

NOMENCLATURA

DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil-sulfóxido
FGFR-1	Receptor tipo 1 del factor de crecimiento de fibroblastos
hpi	Horas postinfección
HPLC	Cromatografía líquida de alto rendimiento
HSPG	Proteoglicanos de sulfato de heparina
ITRs	Terminaciones invertidas repetidas
MDI	Multiplicidad de infección
NLS	Señal de localización nuclear
PLA2	Fosfolipasa 2
polh	Promotor de poliedrina
PPVs	partículas pseudovirales
rpm	Revoluciones por minuto
SCI-BV	Sistema de células de insecto baculovirus
SFB	Suero fetal bovino
TDI	Tiempo de infección
TRS	Sitio terminal de resolución
UFP	Unidad formadora de placa
URF	Unidades relativas de fluorescencia
VAA-2	Virus adenoasociado tipo 2
vVAA	Vectores de virus adenoasociado
ρ	Densidad

RESUMEN

El interés de la biotecnología en la producción de vectores virales recombinantes ha aumentado en los últimos años debido a su potencial aplicación en la terapia génica, donde el virus adenoasociado tipo 2 (VAA-2) ha mostrado en estudios pre-clínicos y clínicos ser de gran utilidad por su inocuidad, estabilidad, baja inmunogenicidad y capacidad de transducir células que han dejado de dividirse. Un vector de virus adenoasociado (vVAA) está constituido por la cápside que está formada por tres proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3) y el genoma recombinante que se desea administrar. Determinar cuál es el requerimiento de las tres proteínas estructurales del VAA-2 para la producción de vectores más eficientes y funcionales, permitirá avanzar en el desarrollo de nuevas terapias. Por lo tanto en este proyecto nos dimos a la tarea de producir cápsides del VAA-2 con diferente estequiometría de las proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3 y evaluar su capacidad de unión e internalización en células de mamífero. Para la expresión independiente de cada una de las proteínas VP en el sistema de células de insecto-baculovirus, se construyeron tres baculovirus recombinantes que codifican por cada una de las proteínas. Además, para tener una proteína reportera dentro de las cápsides que nos permitiera evaluar su capacidad de unión e internalización en las células de mamífero, se construyeron otros tres baculovirus donde en el extremo amino terminal de cada una de las proteínas VP se fusionó EGFP. Se realizaron coinfecciones de células de insecto (Sf9) con los baculovirus recombinantes, en donde se logró el ensamblaje de cápsides de 20-25 nm de diámetro. La cromatografía de intercambio aniónico y el posterior uso de gradientes de cloruro de cesio, nos permitió purificar cápsides morfológicamente similares a las del virus silvestre, con diferente composición de sus proteínas estructurales y que fluorescieron a 510 nm al ser excitadas a 488 nm. Todas las cápsides producidas tuvieron la capacidad de unirse y ser internalizadas por las células de mamífero HEK293T, pero por citometría de flujo se observó que las cápsides con EGFP-VP3 con una estequiometría de 2:1:6 (VP1:VP2:VP3) tuvieron la mayor eficiencia de internalización, con un 87% de células positivas. Los resultados de este trabajo permitirán el desarrollo de vectores con mayor eficiencia de infección para su uso en terapia génica o para otras aplicaciones en bionanotecnología.

INTRODUCCIÓN

El interés de la biotecnología en la producción de vectores virales recombinantes ha aumentado en los últimos años debido a su potencial aplicación en la terapia génica. Esta terapia trata de complementar o sustituir el defecto en la función de un gen, introduciendo otra copia funcional en la célula o introducir la información genética que permita sintetizar una proteína heteróloga que tenga un efecto terapéutico nuevo. Un resultado terapéutico exitoso sólo puede ser alcanzado si hay una eficiente transducción de las células diana y una expresión génica estable por largos periodos de tiempo, así como una baja toxicidad y una respuesta inmunológica mínima. Los vectores de virus adenoasociado (vVAA) son vehículos que permiten la entrega de material genético al interior de la célula blanco. Pueden introducirse y transducir de manera estable una amplia variedad de células y tejidos tales como cerebro, hígado, músculo, retina entre otros (During et al. 1998; Song et al. 1998; Rivera et al. 1999; Acland et al. 2001). Un vector de virus adenoasociado está constituido por la cápside que está formada por tres proteínas estructurales (VP1, VP2 y VP3) y el genoma recombinante que se desea administrar. Actualmente se cuenta con el sistema de células de insecto-baculovirus (SCI-BV) para la producción de partículas pseudovirales (PPVs), el cual es altamente versátil y tiene diversas ventajas sobre otros sistemas, como crecer en suspensión, alta eficiencia de producción, formación de estructuras complejas con más de un tipo de proteínas y no requiere de medios suplementados con suero fetal bovino, lo cual hace el proceso más robusto y seguro. Un mejor entendimiento de la interacción entre las subunidades proteicas que conforman la cápside del vVAA será muy útil para el diseño de estrategias conducentes al mejoramiento del ensamblaje de las proteínas estructurales y a la obtención de partículas con mayor capacidad transductora o con una mayor especificidad de tejido o células blanco. Determinar cuál es el requerimiento de las tres proteínas estructurales del vVAA para la producción de vectores funcionales, permitirá avanzar en el desarrollo de nuevas terapias. Por lo tanto en este proyecto se pretende obtener cápsides del vVAA-2 con diferentes proporciones de las proteínas VP1, VP2 y VP3 individuales y fusionadas con el gen reportero EGFP, el cual permitirá evaluar las diferentes composiciones de las cápsides y su capacidad de unión e infección a células de mamífero.

ANTECEDENTES

Terapia Génica y Vectores Virales

La terapia génica unifica los principios de la farmacología con los de la biología molecular, pues implica tácitamente el empleo de ácidos nucleicos como el agente farmacológico para el tratamiento de diferentes patologías. Con esto la terapia génica persigue modificar el genoma de las células somáticas transfiriendo copias funcionales de genes para que produzcan cantidades adecuadas del producto génico, cuya acción corregiría alguna enfermedad. Por otra parte, en otras situaciones lo que se intenta es lo contrario, es decir, inhibir o bloquear el funcionamiento de aquellos genes que contribuyen al desarrollo de la enfermedad (ej. cáncer). Existen otras posibilidades de acción de la terapia donde lo que se busca es introducir información genética nueva a la célula que le permita sintetizar una proteína con un efecto terapéutico.

Los vectores virales son vehículos que permiten la transferencia de material genético al interior de la célula. Actualmente se están empleando para combatir una gran variedad de enfermedades como distrofia muscular, fibrosis cística, hemofilia B, enfermedad de Parkinson, errores innatos del metabolismo, regeneración de retina y algunos tipos de cáncer, entre otros padecimientos (Lai et al. 2002; Grimm and Kay 2003; Goncalves 2005; Alexander et al. 2008).

Los vectores de virus adenoasociado se han convertido en vehículos muy prometedores por su inocuidad, baja inmunogenicidad, estabilidad, capacidad de transducir células que han dejado de dividirse, como en el músculo (Kessler et al. 1996), hígado (Snyder et al. 1997), cerebro (Kaplitt et al. 1994), y el ojo (Flannery et al. 1997), además de permitir la expresión de la proteína recombinante por largos periodos de tiempo y la factibilidad de producir altos títulos de vectores con capacidad transductora. En estos vectores el 96% del genoma viral es reemplazado por casetes de expresión de eucariotes, incluyendo elementos regulatorios apropiados tejido específicos y el transgen que se desea administrar. La integración sitio específica del genoma viral nativo en el genoma de la célula hospedera (cromosoma 19 en humanos) no produce efectos adversos, permite la expresión prolongada del gen terapéutico y reduce la necesidad de administrar dosis

frecuentes del vector. En ausencia de la coinfección con un virus *helper* (adenovirus o herpesvirus), el genoma del VAA se integra en el genoma de la célula hospedera en los sitios de integración AAVS1, los cuáles son ricos en GC y elementos GCTC repetidos en tándem que sirven como sitios de unión para las proteínas virales Rep 78/68 que se producen en muy poca cantidad. Por el contrario cuando una célula con el genoma del VAA integrado es coinfectada por adenovirus, las proteínas adenovirales E1A, E1B y E4 inducen la síntesis de Rep 78/68 en grandes cantidades, haciendo que el genoma del VAA se escinda e inicie un ciclo productivo, manteniéndose el genoma de forma episomal.

Virus adenoasociado tipo 2

El virus adenoasociado tipo 2 (VAA-2) pertenece a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus*. Tiene como hospederos naturales a animales vertebrados, sin que hasta la fecha se haya producido algún tipo de enfermedad atribuible al mismo. Para poder replicarse efectivamente necesita de la coinfección con virus auxiliares como herpesvirus o adenovirus, por lo que se cataloga como un virus defectuoso (Berns 1990). Su genoma es ADN de cadena sencilla de 4.7 Kb encapsidado en un virión de simetría icosaédrica de 20 – 25 nm de diámetro (Xie et al. 2002). Terminaciones invertidas repetidas (ITRs) flanquean la región codificante de las proteínas no estructurales Rep, que participan en la replicación y encapsidación del genoma viral, y las proteínas estructurales VP, que conforman la cápside del virus. Las proteínas Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40 están codificadas por los genes *rep* (Replicación), bajo los promotores p5 y p19, mientras que las proteínas VP1, VP2 y VP3 están codificadas por los genes *cap* (Cápside) bajo el promotor p40 (Figura 1). Los 145 nucleótidos terminales de ambos extremos son autocomplementarios y las secuencias están organizadas en dúplex intramoleculares estables formando una estructura de horquilla o *hairpin* en forma de T. Esta estructura de *hairpin* funciona como origen de replicación del ADN viral, sirviendo como *primer* para el complejo ADN polimerasa (Urabe et al. 2002; Hickman et al. 2004). Por este motivo, las ITR son esenciales para la replicación del ADN de cadena sencilla del virión en ADN de doble cadena dentro de la célula hospedera, para la posterior transcripción del genoma

viral (McCarty et al. 2004). Dentro de estas secuencias terminales están incluidos además un sitio de unión para las proteínas Rep (RBS), que consiste en varias repeticiones del tetranucleótido 5'-GAGC-3' (Chiorini et al. 1995) y un sitio terminal de resolución (TRS), que es una secuencia sensible a la actividad endonucleasa de las proteínas Rep. Estos sitios resultan indispensables para llevar a cabo la replicación y encapsidación del genoma viral (Ward et al. 1994; McCarty et al. 2004). Por tanto, las ITR son las únicas secuencias del genoma viral que se requieren *in cis* para la replicación y el empaquetamiento del ADN durante la producción del vVAA.

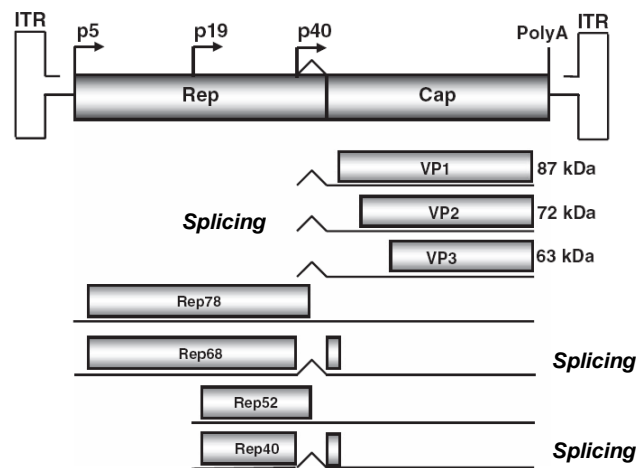


Figura 1. Genes y promotores del VAA-2 (Van Vliet et al. 2008).

Las proteínas no estructurales Rep (Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40), son necesarias para la replicación del genoma viral y su encapsidación. Todas las proteínas Rep poseen actividad helicasa dependiente de ATP y sólo Rep78 y Rep68 presentan actividad endonucleasa en un dominio de su extremo amino terminal y secuencias de unión a ADN. Las proteínas Rep78 y Rep68 se unen al RBS de la ITR ligada covalentemente durante la replicación del genoma y realizan un corte en el TRS. Se ha observado que Rep78 permanece unida covalentemente al extremo 5' del sitio de corte. En resumen, la función primaria de Rep78 y Rep68 es cortar el extremo de la ITR cerrado covalentemente para obtener 2 hebras de ADN que sirvan de templado en un posterior ciclo de replicación.

Una vez que el ADN ha sido replicado es empaquetado en las cápsides virales previamente ensambladas a partir del extremo 3'. Durante etapas tempranas de la infección del VAA silvestre, las proteínas no estructurales se traducen y son transportadas al interior del núcleo donde ocurre la replicación del ADN viral. Se ha observado que en etapas más avanzadas de infección, las proteínas Rep y VP colocalizan en el núcleo donde ocurre la encapsidación del genoma viral (Hunter and Samulski 1992; Wistuba et al. 1995).

Proteínas estructurales

La cápside del VAA-2 en su forma silvestre está conformada por 60 subunidades de las proteínas VP1 (87 KDa), VP2 (72 KDa) y VP3 (63 KDa) en una relación estequiométrica 1:1:10 y un arreglo geométrico T=1 de simetría icosaédrica (Rose et al. 1971; Buller and Rose 1978) (Figura 2). Estas proteínas se expresan a partir de los genes *cap* bajo el promotor p40 y por procesamiento o *splicing* alternativo se generan dos transcritos, uno de 2.6 kb, a partir del cual se traduce VP1 y otro de 2.3 Kb, del que se traducen VP2 y VP3 utilizando codones de inicio diferentes, por lo cual la regulación de la producción de las proteínas estructurales es tanto a nivel transcripcional como traduccional (McPherson and Rose 1983; Becerra et al. 1988). La secuencia de las tres proteínas VP son idénticas en su extremo carboxilo terminal y solo difieren en la longitud de su extremo amino terminal, siendo VP2 137 aminoácidos más corta que VP1 y VP3 65 aminoácidos más corta que VP2. Estas proteínas adoptan una conformación de varias hojas plegadas β intercaladas con largas asas o *loops* (HI, GH) que corresponde aproximadamente al 60% de la estructura (Xie et al. 2002). La longitud, el arreglo y distribución de estos *loops* diferencian al VAA de otros parvovirus, además de ser los dominios de superficie de la cápside que interaccionan con anticuerpos y receptores celulares. La característica más prominente de la cápside del VAA son tres espículas agrupadas alrededor del eje de rotación de simetría tres, donde se han identificado los dominios de interacción con sus receptores en la célula huésped (Figura 2).

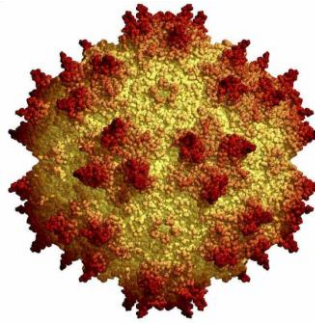


Figura 2. Cápside del VAA-2. Tomada de Jean-Yves Sgro 2004. www.virology.wisc/virusworld.

La proteína VP1 tiene una secuencia N terminal única la cual contiene un dominio fosfolipasa A2 (PLA2) y una señal de localización nuclear (NLS) que le permite ser transportada del citoplasma, donde es producida, hasta el núcleo para el ensamblaje de las cápsides. El dominio PLA2 le permite hidrolizar los fosfolípidos de las membranas durante el escape del virus de la ruta endocítica, y se ha observado que la ausencia de este dominio reduce la infectividad del virus (Girod et al. 2002). VP2 es la proteína de tamaño intermedio entre las tres VPs y también posee NLS, y aunque se ha sugerido que no es indispensable para el ensamblaje y la infección del virus, parece ser importante para el transporte de VP3 al núcleo (Hoque et al. 1999; Grieger et al. 2006). Las proteínas VP se sintetizan en el citoplasma de la célula y son transportadas hacia el interior del núcleo y posteriormente al nucléolo para el ensamblaje de las cápsides virales, proceso que parece ser dependiente de la concentración de proteínas VP (Redemann et al. 1989; Wistuba et al. 1997). Sin embargo, durante las primeras etapas de la infección del VAA silvestre no se observa ensamblaje de partículas en el citoplasma a pesar de la alta concentración de proteínas VP, pero sí en el núcleo. Se ha sugerido que existen factores en el núcleo de la célula que son necesarios para el ensamblaje de las partículas virales. (Steinbach et al. 1997) produjeron *in vivo* y purificaron las tres proteínas por separado para después tratar de ensamblar las cápsides *in vitro*, pero ni con el uso de chaperonas fue posible lograrlo, solo cuando se utilizaron las tres proteínas simultáneamente y extracto de células HeLa se observó un escaso número de partículas virales. En etapas posteriores de infección se empieza a detectar la presencia de cápsides virales en el resto del núcleo. Este hecho sugiere que el ensamblaje de

partículas de VAA se inicia en el nucléolo y que posteriormente se extiende al resto del núcleo de la célula (Wistuba et al. 1997).

Para que un vVAA pueda transducir células eficientemente es muy importante que su cápside este correctamente ensamblada y pueda superar las diferentes barreras biológicas que limitan el proceso de transducción. Entre estos pasos limitantes se encuentra: 1) la unión al receptor en la superficie de la célula blanco, 2) la endocitosis mediada por receptor de la partícula viral, que puede estar influenciada por la presencia de co-receptores y la activación de vías de señalización intracelulares que inducen la endocitosis, 3) el tráfico vesicular hasta el núcleo, 4) escape del virus del endosoma y 5) la entrada y desnudamiento del material genético viral en el núcleo (Figura 3). Proteoglicanos de sulfato de heparina (HSPG) han sido identificados como el receptor principal en la unión del VAA-2 a la célula blanco, lo cual define el tropismo del virus por ciertos tejidos que expresan este receptor (Shi et al. 2006). Varios estudios se han realizado para determinar cuáles son los aminoácidos o los dominios que interaccionan con el HSPG y se ha identificado que las argininas 484, 487, 585, 588, y la lisina 472 ubicados en el extremo carboxilo terminal (loop HI), secuencia que es común para las tres proteínas VP, forman un dominio básico alrededor del eje de simetría tres que le permite a la cápside viral unirse a su receptor en la célula blanco (Kern et al. 2003; Opie et al. 2003). Además de la interacción con el receptor, se necesita de la participación de co-receptores para una infección eficiente. Para el VAA-2 se han identificado hasta la fecha varios co-receptores entre los que se encuentran las integrinas $\alpha V\beta 5$, el receptor tipo 1 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR-1) y el receptor para el factor de crecimiento de hepatocitos (c-met). La unión de la cápside con el receptor y el co-receptor activa una vía de señalización intracelular que induce la endocitosis del receptor, proceso que es mediado por clatrina y dependiente de dinamina (Duan et al. 1999). Como se mencionó anteriormente, la actividad fosfolipasa A2 del extremo amino terminal único de VP1 es importante para el escape del virus de la ruta endocítica, pues se ha observado que el pH ácido del endosoma tardío induce cambios conformacionales en la cápside que le permite al virus exponer su extremo N terminal que se encuentra hacia el interior, para hidrolizar los fosfolípidos de la membrana endosomal. Este dominio está conformado por

59 aminoácidos ubicados desde la posición 45 (leucina) hasta la 103 (arginina) de la secuencia N terminal de la VP1, que está altamente conservado entre todos los parvovirus. Este dominio también tiene un asa de unión a Ca^{++} y un motivo HDXXY en su sitio catalítico (Zadori et al. 2001).

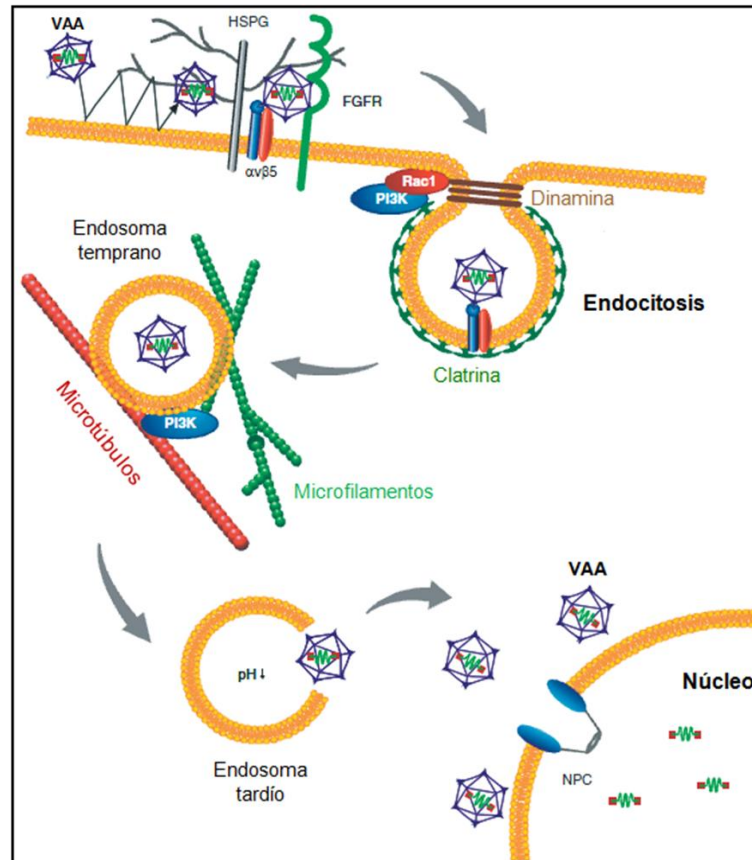


Figura 3. Modelo de infección del VAA-2. La entrada del VAA se da por la interacción de la cápside con su receptor y co-receptor en la superficie de la célula hospedera, lo cual induce un proceso de endocitosis y rearrreglos del citoesqueleto que le permiten al VAA el tráfico hasta el núcleo. Una vez dentro del núcleo el genoma viral puede ser replicado eficientemente o integrarse en el genoma de la célula. Modificado de (Buning et al. 2008).

Una vez dentro del núcleo la presencia o ausencia de la coinfección con un virus auxiliar (adenovirus o herpesvirus), define si el VAA produce una infección latente o entra en un ciclo productivo de replicación, con la consecuente lisis de la célula hospedera. En ausencia de los de los virus auxiliares el VAA entra en un ciclo latente y se integra de

manera sitio específica en el sitio AAVS1 en el cromosoma 19 humano (19q13.3). Antes de la integración, se activa la expresión basal de las proteínas Rep y se sintetiza la cadena complementaria del ADN viral. Las proteínas Rep se unen al genoma viral en los RBS dentro de las ITRs y a secuencias homologas localizadas en el locus AAVS1 y median la integración. Los provirus integrados pueden ser rescatados por la coinfección de la célula hospedera con un virus auxiliar, donde la inducción de la expresión génica y replicación del VAA ocurren inmediatamente. Las proteínas adenovirales E1, E2A, E4 y las herpesvirus UL5, UL8, UL29, y UL52 han sido identificadas como las responsables de proporcionar las funciones auxiliares.

Hasta la fecha no se ha estudiado si la fusión de un péptido o una proteína como EGFP en el extremo amino terminal de VP1 pueda afectar la eficiencia de ensamblaje y capacidad infectiva de las partículas virales producidas *in vivo*. Se ha observado que al mutar los aminoácidos importantes del sitio catalítico de su dominio fosfolipasa, no se ve afectada la capacidad de ensamblaje de las cápsides, la replicación y empaquetamiento del ADN, ni la capacidad de unión y entrada en la célula hospedera, pero si se ve afectada su capacidad transductora (Zadori et al. 2001; Girod et al. 2002). Con respecto a VP2, se sabe que la fusión con GFP no interfiere ni con el ensamblaje de las cápsides ni con su capacidad infectiva; por el contrario, ha permitido hacer seguimiento del proceso de infección y del tráfico intracelular (Lux et al. 2005). Por otra parte se ha observado que la inserción de péptidos pequeños (32 aminoácidos) en el extremo N terminal de VP3 no afecta la producción de la proteína, ni el ensamblaje de las cápsides (Hoque et al. 1999). Sin embargo, la inserción de péptidos más grandes como leupeptina (146 aminoácidos), suprime la expresión de la proteína e impide el ensamblaje de las cápsides (Warrington et al. 2004).

Para un mejor entendimiento de los requerimientos e interacciones de las proteínas VP en la formación de las cápsides virales vacías, se han producido *in vivo* estas proteínas estructurales obteniendo en algunos casos resultados contradictorios. Ruffing et al. (1992) expresaron en células Sf9 las tres proteínas VP por separado y en combinación entre ellas, usando baculovirus recombinantes a una multiplicidad de infección fija de 5 unidades formadoras de placa por célula (UFP/célula), y observaron la formación de

cápsides al coexpresar VP1 y VP2; VP2 y VP3 o las tres proteínas juntas. Cuando estas proteínas se expresaron individualmente, sólo VP2 fue capaz de producir cápsides, lo cual sugiere que la presencia de VP2 es necesaria para el ensamblaje de las partículas virales. De acuerdo con lo anterior Hoque et al. (1999), usando también el sistema de células de insecto baculovirus para expresar las proteínas VP2 y VP3, observaron la formación de cápsides al coexpresar estas dos proteínas independientemente de la relación VP2/VP3 usada, y concluyeron que VP1 no es necesaria para el ensamblaje de las partículas, pero sí para la infectividad del virus, lo cual ha sido observado en otros estudios. Por su parte, Warrington et al. (2004), a través del uso de plásmidos recombinantes para la expresión de las proteínas VPs y Rep, transfectaron células HEK293 en conjunto con un plásmido auxiliar o “*helper*” que codifica para las proteínas de adenovirus que actúan en *trans* (E1A, E1B) y son necesarias para la producción de vectores recombinantes de VAA en un sistema libre de adenovirus. Ellos obtuvieron partículas virales sólo cuando se expresó VP1 y VP3; VP2 y VP3; VP1, VP2 y VP3; o sólo VP3, indicando que únicamente VP3 es necesaria para la formación de partículas virales. Además observaron que VP2 parece ser redundante y no es necesaria para la infectividad del virus, pues al expresar sólo VP1 y VP3 obtuvieron partículas pseudovirales con capacidad infectiva dentro de un factor de 4 con respecto a las partículas WT. También se ha reportado que la estequiometría propuesta de 1:1:10 (VP1:VP2:VP3) en los virus silvestres (Buller and Rose 1978), no es la misma en las partículas pseudovirales producidas *in vivo* tanto en células de insecto (Sf9) como en células de mamífero HEK293 (Ruffing et al. 1992; Kronenberg et al. 2005; Meghrou et al. 2005; Aucoin et al. 2006).

Para que un vVAA pueda transducir células eficientemente es muy importante que su cápside este correctamente ensamblada y pueda ser internalizada, por lo cual en este trabajo nos dimos a la tarea de producir cápsides de VAA-2 con diferentes estequiometrías de sus proteínas estructurales. Esto se hizo por medio de la coinfección de células de insecto (Sf9) con baculovirus recombinantes, cuyos genomas codifican para las tres proteínas VP independientemente y fusionadas con EGFP. A través del uso de distintas MDI de cada baculovirus e incluyendo una de las proteínas fusión (EGFP-VP) en

cada condición, fue posible ensamblar partículas virales con diferente proporción de sus proteínas estructurales y con un reportero que nos permitió evaluar su capacidad de infectar células de mamífero por microscopía confocal, microscopía de epifluorescencia y citometría de flujo. El conocimiento generado nos permitirá avanzar en el entendimiento de cómo la composición de las cápsides de VAA influyen en la capacidad de unión e internalización en las células hospederas.

Baculovirus

Baculovirus es un virus de 250-300 nm de longitud y 30-60 nm de diámetro (Figura 4). Pertenece a la familia *Baculoviridae*, cuyos miembros se caracterizan por ser patógenos sólo para artrópodos. La mayoría tienen como hospederos naturales a insectos lepidópteros (mariposas y polillas), aunque también se han aislado de dípteros (mosquitos), himenópteros (avispa) y crustáceos. Su genoma es ADN circular de doble cadena de hasta 230 Kb empacado en una cápside en forma de barra, que en el caso de los virus no ocluidos está envuelta por una membrana externa que es adquirida al salir de la célula infectada (Figura 4). Una característica de baculovirus es la formación de cápsulas proteicas llamadas cuerpos de oclusión compuestas por la proteína poliedrina (O'Reilly et al. 1994).

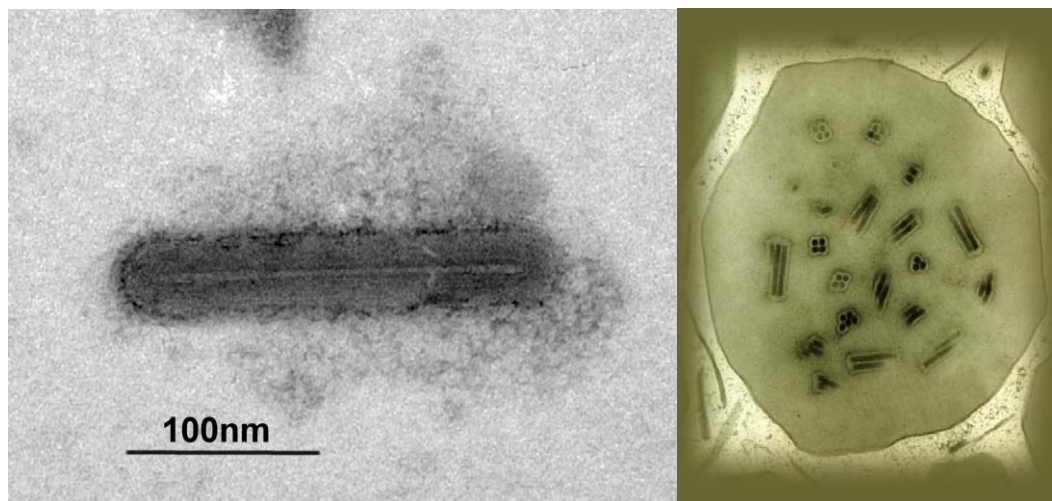


Figura 4. Baculovirus (a) y poliedro formado por un baculovirus silvestre (b). Tomada de www.tamu.edu/summerslab/images/bevs.

El baculovirus AcMNPV (Nucleopoliedrovirus de Multicápside de *Autographa californica*) es el más estudiado, además de ser ampliamente utilizado en el SCI-BV por ser capaz de infectar cerca de 30 líneas celulares (Palomares et al. 2006). Su genoma, de 131 Kb, contiene al promotor *polh* que regula la expresión del gen que codifica para la poliedrina. En general, se producen baculovirus recombinantes sustituyendo el gen de poliedrina o el gen *p10* por el de la proteína de interés, de esta manera es posible obtener rendimientos de hasta 50% de proteína recombinante con respecto a la proteína total (Palomares et al. 2002; Palomares et al. 2006).

El ciclo de replicación de baculovirus está dividido en 4 etapas (Figura 5). Durante la fase temprana inmediata (0-4 hpi), los viriones migran hacia el núcleo celular donde el ADN viral es liberado de la cápside. En esta fase se inicia la expresión de genes tempranos que codifican para enzimas involucradas en la replicación de ADN y para activadores transcripcionales involucrados en la expresión de genes tardíos. La fase temprana (4-7 hpi) se caracteriza por rearrreglos en el citoesqueleto y núcleo celular, así como por la degradación del ADN de la célula hospedero. Durante esta fase el gen *p35* expresa un inhibidor apoptótico para evitar el suicidio celular. En la fase tardía (7-20 hpi) se lleva a cabo la replicación del ADN viral y se expresan los genes que codifican para las proteínas estructurales. Durante esta etapa se producen los virus no ocluidos (carecen de poliedrina) que son liberados para infectar otras células. Durante la fase muy tardía (18-120 hpi) se expresan los genes *polh* y *p10*; por tanto, en un sistema recombinante que utiliza estos promotores, esta es la etapa en la que se genera el producto de interés (O'Reilly et al. 1994; Palomares et al. 2006). El ciclo de replicación de un baculovirus recombinante es idéntico al del baculovirus silvestre, y difieren sólo en que en el primero no se generan cuerpos de oclusión en la fase muy tardía debido a que el gen de poliedrina ha sido sustituido por el gen de interés.

Sistema Células de Insecto-Baculovirus (SCI-BV)

El SCI-BV es usado ampliamente para producir proteínas recombinantes de interés comercial, vectores y partículas pseudovirales (Ruffing et al. 1992; Urabe et al. 2002; Mena et al. 2006). Este sistema consiste en un vector viral (un baculovirus recombinante)

que infecta células de insecto y utiliza la maquinaria celular para replicarse y expresar el producto recombinante. Los genes recombinantes contenidos en el vector se encuentran generalmente bajo promotores que inducen altos niveles de expresión tales como el de poliedrina (*polh*) o el *p10*. En la infección de células de insecto por baculovirus nativo, la proteína expresada bajo el promotor *polh* 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 poliedrina, por el gen de la proteína que se desea expresar (Palomares et al. 2006).

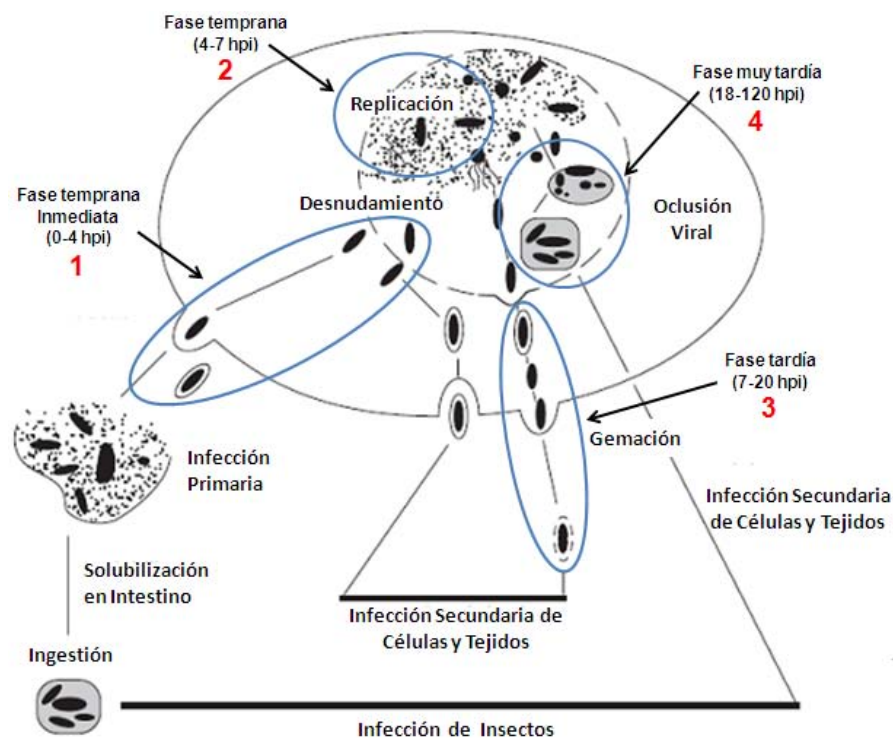


Figura 5. Ciclo de replicación del baculovirus silvestre (Modificado de Murphy et al. 2004).

Actualmente existen diversas líneas celulares de insecto que pueden ser empleadas según los objetivos deseados y del baculovirus que se desee utilizar (Tabla 1). Entre las líneas celulares más utilizadas están la Sf9 de *Spodoptera frugiperda* y la Tn5B1-4 de *Trichoplusia ni* (conocida comercialmente como High Five™). Se ha reportado que la producción de vVAA-2 es hasta un orden de magnitud mayor en células de insecto que en células de mamífero (HEK293, HeLa) (Aucoin et al. 2008).

Tabla 1. Algunas líneas celulares de insecto^a

Especie	Origen celular	Baculovirus que las infectan
<i>Anticarsia gemmatalis</i>	Embrión	<i>AgMNPV, AcMNPV</i>
<i>Bombyx mori</i>	Ovario de larva	<i>BmNPV, AcMNPV, HaNPV</i>
<i>Mamestra brassicae</i>	Larva neonato	<i>AcMNPV, MbNPV</i>
<i>Manduca sexta</i>	Ovario de pupa	<i>AcMNPV</i>
<i>Trichoplusia ni</i>	Ovario adulto	<i>AcMNPV, TnNPV, AgMNPV</i>
<i>Spodoptera exigua</i>	Ovario de pupa	<i>AcMNPV, SexiNPV</i>
<i>Spodoptera frugiperda</i>	Ovario adulto	<i>AcMNPV, TnNPV, SfNPV, TnNPV, SexiNPV</i>

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

El SCI-BV resulta sumamente útil en la producción de vectores virales por diversas razones: 1) las células de insecto se pueden cultivar e infectar en suspensión, lo que facilita el escalamiento del proceso; 2) éstas realizan modificaciones postraduccionales similares a las que realizan las células de mamífero, de manera que las proteínas expresadas pueden conservar su funcionalidad biológica; 3) es posible expresar simultáneamente uno o varios genes recombinantes de alto peso molecular; 4) los niveles de expresión que se obtienen son altos en comparación con otros sistemas de expresión de eucariotes superiores; 5) se pueden utilizar líneas celulares adaptadas a medios sin suero, lo que reduce los costos de producción; y 6) permite manipular la concentración de los productos recombinantes de manera relativamente sencilla, lo que facilita estudiar la producción de vectores virales empleando distintas relaciones estequiométricas entre los componentes (O'Reilly *et al.* 1994; Palomares *et al.* 2006).

Parámetros que influyen en la producción de proteínas recombinante en el SCI-BV.

Un sistema óptimo de producción de vVAA es aquel en el cual se obtiene una máxima concentración de vectores con capacidad transductora, mientras que la acumulación de proteína no ensamblada y de partículas no transductoras sea mínima. Para esto es necesario que todos los elementos que conforman al vVAA se encuentren en una relación estequiométrica adecuada, misma que aún no ha sido determinada. Los parámetros más

importantes en el SCI-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 (Hu and Bentley 2001; Hu and W. 2001).

La multiplicidad de infección (MDI) se define como el número de partículas infectivas que son adicionadas por cada 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. Cabe resaltar que el número de partículas que infecta una célula está determinado por una distribución probabilística, la cual puede ser descrita por la ecuación de Poisson (Figura 6 y Ecuación 1).

$$P = \frac{(MDI)^r e^{-MDI}}{r!}$$

Ecuación 1. Distribución de Poisson

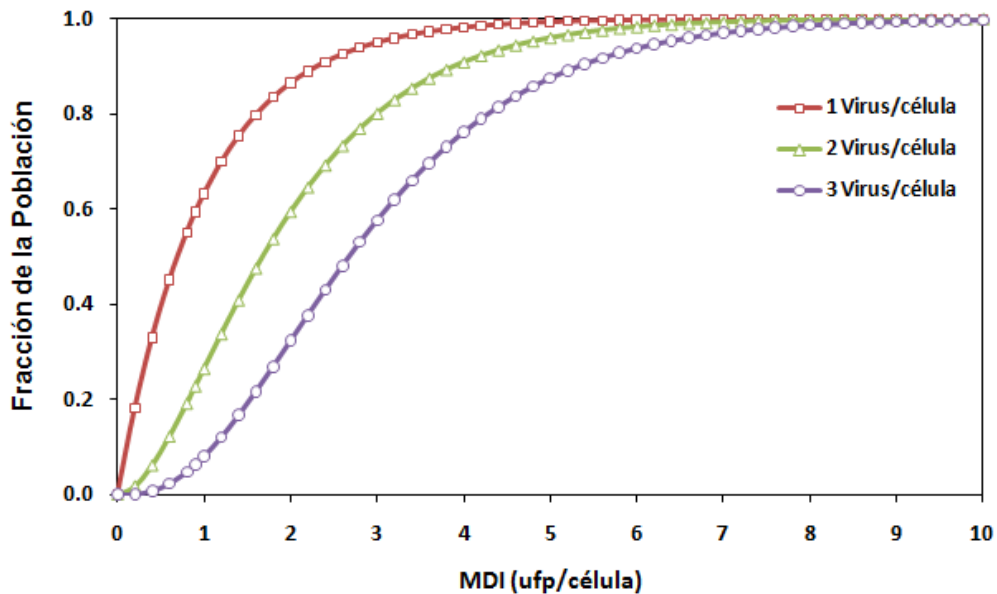


Figura 6. Distribución de Poisson. Probabilidad de que una célula sea infectada con n partículas virales dependiendo de la MDI.

En la ecuación 1, P es la probabilidad que una célula esté infectada por r partículas infecciosas. La MDI es uno de los parámetros más determinantes en el SCI-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 and Bailey 1992; Tsao et al. 1996; Wong et al. 1996; Palomares et al. 2002).

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 nutrientes necesarios para obtener los niveles de expresión deseados, por lo cual se infecta en la fase exponencial donde todavía no se han agotado y la producción de ácidos orgánicos es mínima.

Citometría de flujo

La citometría de flujo es una metodología muy conocida en la práctica clínica, la investigación y la microbiología, por su capacidad de análisis cualitativo y cuantitativo de células y partículas. Ha sido ampliamente usada para el análisis de poblaciones heterogéneas de células eucariotas, organelos celulares y microorganismos. Esta metodología permite una rápida medición de distintos parámetros en células individuales, principalmente por medios ópticos. La medición multiparamétrica de la dispersión de la luz (*scattering*) y fluorescencia de las células al pasar una por una a través de un láser, permite la distribución o selección de células de acuerdo a sus propiedades físicas o bioquímicas tales como, tamaño, granularidad, contenido de ácidos nucleicos, actividad enzimática y presencia de determinantes antigénicos.

Anteriormente se consideraba imposible detectar y analizar partículas virales por citometría de flujo debido a su pequeño tamaño, pero Hercher et al. (1979), usando un citómetro de flujo modificado y pequeños volúmenes de muestra a un flujo lento, fue capaz de detectar al bacteriófago T2 utilizando el parámetro de dispersión de la luz. La introducción de colorantes fluorescentes para ácidos nucleicos, que emiten en el espectro de luz verde después de ser excitados a 480 nm, mejoró considerablemente el límite de detección y el número de virus analizados en citómetros de flujo estándares como el FACSort (BD); de este modo, se detectaron virus de diferentes tamaños como los de la familia Baculoviridae de 300 nm, hasta virus de 30 nm de la familia Picornaviridae (Marie et al. 1999; Brussaard et al. 2000; Brussaard 2004). Sin embargo, el uso de estos colorantes se ve afectado por diferentes factores como la concentración de los ácidos nucleicos, las soluciones usadas para diluir la muestra, la temperatura de incubación y el uso de detergentes, además de que no permite detectar partículas virales vacías. Las proteínas fluorescentes han revolucionado el campo de la genética y la biología celular, pues ha permitido el estudio de procesos biológicos *in vitro* e *in vivo* por distintas metodologías como microscopía de fluorescencia, confocal y citometría de flujo entre otras. En nuestro trabajo utilizamos las fusiones de EGFP con las proteínas estructurales de VAA-2 para el ensamblaje de las cápsides *in vivo* con diferente estequiometría de estas proteínas, lo cual nos permitió evaluar la capacidad de las distintas cápsides de unirse e internalizarse en células de mamífero.

HIPÓTESIS

Las cápsides del virus adenoasociado tipo 2 (VVA-2) con distintas estequiometrias entre sus proteínas estructurales tienen diferente capacidad de unión e internalización en células de mamífero.

OBJETIVOS

Objetivo general

Entender cómo la composición de las cápsides del virus adenoasociado tipo 2 afecta su capacidad de unión e internalización en células de mamífero.

Objetivos específicos

1. Construir seis baculovirus recombinantes que expresen las proteínas VP1, VP2 y VP3 independientemente, y cada una de estas proteínas fusionadas con EGFP.
2. Producir cápsides de VAA-2 marcadas con EGFP y con diferente estequiometría de sus proteínas estructurales.
3. Estandarizar un método para la purificación de cápsides de VAA-2 fusionadas con EGFP.
4. Determinar la composición y estequiometría de las cápsides del VAA-2 ensambladas *in vivo*, al infectar células de insecto con diferentes MDI de los baculovirus recombinantes.
5. Evaluar la capacidad de unión e internalización de las cápsides con diferente composición de sus proteínas estructurales en células de mamífero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Para la producción de los baculovirus recombinantes se utilizó la línea celular Sf9 proveniente de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda* (ATTC CRL 1711). La línea celular se mantuvo en 30ml de medio de cultivo SF-900 II libre de suero (GIBCO, USA) a 27 °C en agitación a 100 rpm, en matraces de 250ml. Para el aislamiento de placas virales los cultivos se mantuvieron en medio TNM-FH, 10% suero fetal bovina (SFB), 0.1% Pluronic™ F-68, a 27 °C. La concentración y la viabilidad celular se determinó utilizando cámara de Neubauer, realizando tinción con azul de tripano. Para el estudio de la capacidad de unión e internalización de las partículas virales producidas se utilizó la línea celular adherente HEK293T procedente de riñón de embrión humano. Esta línea celular fue mantenida en medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, SIGMA) suplementado con NaHCO₃ (3.7 g/L), L-Glutamina (292 mg/L), piruvato de sodio (110mg/mL), HEPES (2.4 g/L), rojo de fenol (15 mg/L), aminoácidos no esenciales 100X (10 ml/L, SIGMA) y 10% de Suero Fetal Bovino (SFB). Para el subcultivo de las células HEK293T, se lavó la monocapa con PBS estéril a 37°C adicionándolo sobre la pared del frasco T para evitar que se desprendieran las células, se removió el PBS y se le adicionó 1 ml de tripsina 0.25% por cada 10 ml de cultivo, se incubó 3 min a 37°C, se le adicionó 9 ml de medio DMEM previamente calentado a 37°C y se transfirieron a un tubo de 15 ml. Luego se centrifugó a 1000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante, posteriormente se adicionó 3 mL de medio y se resuspendieron para realizar el conteo y sembrar un nuevo frasco T con 10 mL de cultivo a 1×10^5 células/mL.

Construcción de baculovirus recombinantes proteínas VPs

Para la expresión independiente de las proteínas estructurales de la cápside del VAA-2 (VP1, VP2 y VP3) en el sistema células de insecto-baculovirus, se usaron los plásmidos desarrollados por Ruffing *et al.*, 1992, donados por el doctor Jurgen A. Kleinschmidt (Cancer Research Center, Heidelberg, Alemania). En estos plásmidos los codones de inicio de la traducción para VP2 y VP3 fueron mutados para una expresión independiente

de VP1 y el codón de inicio de VP3 fue mutado para la expresión de VP2 (Figura 7). Posteriormente la secuencia codificante para cada VP fue clonada en el vector pVL1393 bajo los sitios de restricción *SmaI-XbaI* para VP1 y *NdeI-XbaI* para VP2 y VP3, generando así los vectores pVL-VPs.

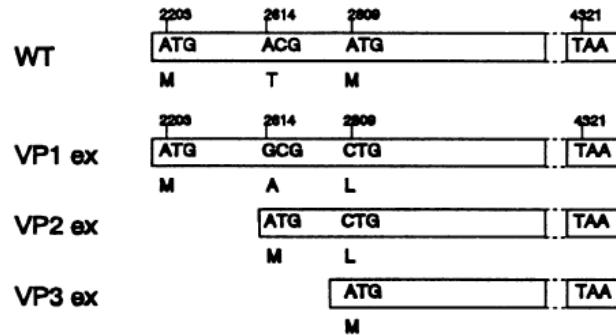


Figura 7. Región codificante de las VPs del VAA-2. Ruffing *et al.*, 1992.

Con el fin de utilizar el sistema de expresión Bac-to-Bac® (Invitrogen, Figura 8) para la producción de los baculovirus recombinantes, se generaron los vectores de transferencia pFastBac-VPs mediante la ligación del fragmento *BamHI-XbaI* de los plásmidos pVL-VPs (VP1 2.3 Kb, VP2 1.9 Kb y VP3 1.7 Kb) en el vector pFastBac™1 (Invitrogen), quedando cada gen de interés bajo el promotor de Poliedrina (*polh*).

Una vez ligado los genes de cada VP en el vector pFastBac™1 se confirmó su inserción y secuencia mediante PCR de las colonias de bacterias, con los oligos pFB *forward* 5'-GGATTATTCATACCGTCCCAC-3' y pFB *reverse* 5'-CTCTACAAATGTCGTATGG CTG-3' y secuenciación de los plásmidos, respectivamente. Los plásmidos fueron purificados usando el kit comercial QIAprep Miniprep (QIAGEN) y enviados a la Unidad de Secuenciación del IBT-UNAM en una mezcla de ADN/oligo (0.5 µg ADN/15 pmol oligo) en un volumen de 16µL. La secuenciación automatizada de ADN usa el método: *Taq FS Dye Terminator Cycle Sequencing Fluorescence - Based Sequencing*. Una vez generado los vectores de transferencia pFastBac-VPs para cada VP se transformaron células competentes DH10Bac (Invitrogen™), las cuales contienen un vector "Shuttle" o lanzadera del baculovirus (bácmido, bMON14272, 136 kb) con sitios blanco mini-attTn7

necesarios para la transposición del gen recombinante y un vector “*helper*” (pMON7124, 13.2 kb) el cual codifica por las proteínas necesarias para la transposición.

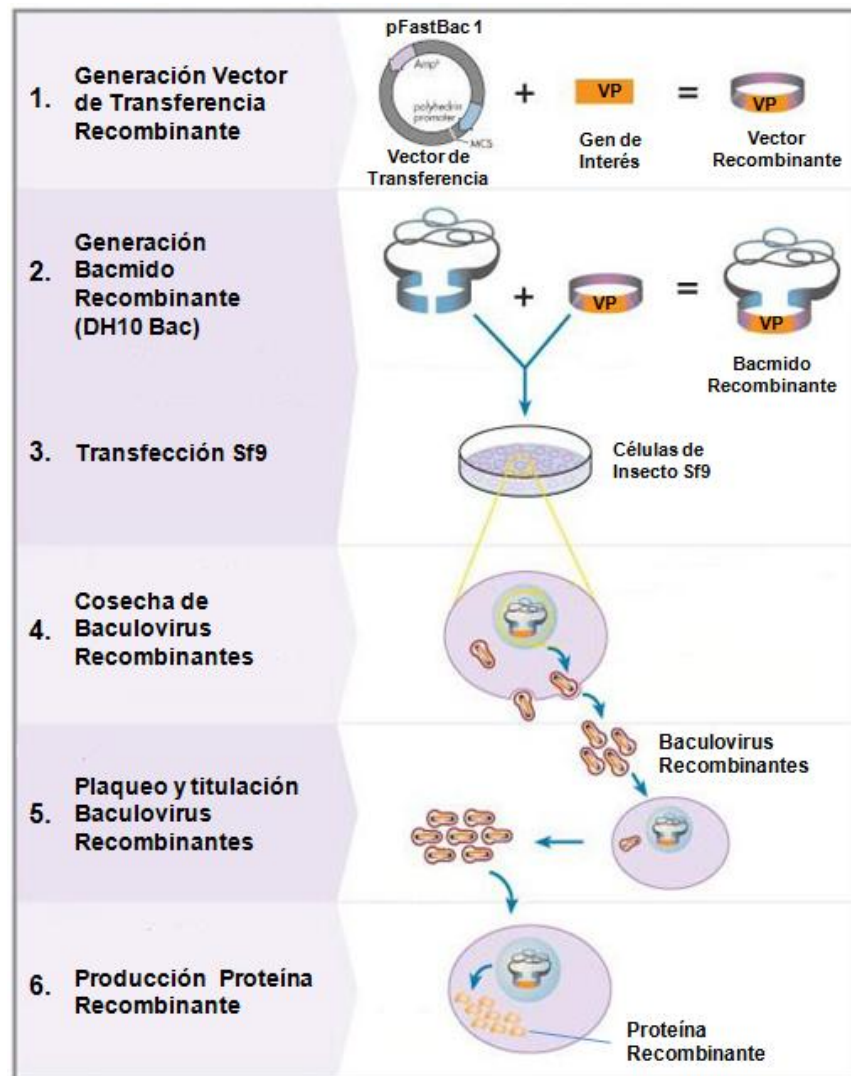


Figura 8. Esquema de producción de baculovirus recombinantes en el sistema Bac-to-Bac.

Brevemente, se adicionó 1 μg del plásmido a 100 μL de células quimicompetentes de *E. coli* DH10Bac, se incubaron en hielo por 30 minutos y luego se sometieron a choque térmico por 1 minuto a 42°C regresándolas inmediatamente al hielo. Luego, se adicionaron 250 μL de medio SOC previamente estabilizado a temperatura ambiente y se incubó a 37°C por 1 hora a 250 rpm. Luego de este tiempo, se sembraron 50 y 100 μL de células de este vial en cajas de medio LB-agar con 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de kanamicina, 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de

gentamicina, 10 µg/mL de tetraciclina, 100 µg/mL de X-Gal y 40 µg/mL de IPTG. Se dejaron incubando las cajas durante 48 horas a 37°C. Las colonias transformadas que contienen el b́acmido recombinante deben ser de color blanco ya que se interrumpe el gen de la β-galactosidasa por la recombinación, las colonias no transformadas seŕan de color azul. Las colonias positivas para el b́acmido recombinante se confirmaron mediante PCR con los oligos M13 *forward* 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC-3' y M13 *reverse* 5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3' (Figura 9). El b́acmido se purificó mediante el método lisis alcalina descrito en el manual del sistema de expresión en baculovirus Bac-to-Bac® (Invitrogen). Para la transfección con el b́acmido se adhieren células Sf9 (9x10⁵ células/pozo) en placas de 6 pozos por 1h a 27°C en medio TNM-FH, se retira el medio y se transfecta la monocapa celular con una mezcla de 15 µl de ADN (b́acmido) y 6 µl del lípido catiónico Celfectina® (Invitrogen) en 1 ml de medio Grace's 1X. Se dejó incubar por 5h a 27°C y después se retiró el medio con el b́acmido, se adicionó medio TNM-FH fresco y se dejó incubar por 5 días a 27°C en ambiente húmedo. A los 5 días se cosecharon las células y se separó el sobrenadante que contiene la progenie viral recombinante por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y las células se resuspendieron en buffer de lisis (Tris-base 50mM, MgCl₂ 2mM, inhibidores de proteasas) para su posterior evaluación por Western blot.

Construcción de baculovirus recombinantes para las fusiones EGFP-VPs

El gen de EGFP fue amplificado mediante PCR a partir del plásmido pFBGFPR desarrollado por Urabe *et al.* (2002), proporcionado por el Dr. Robert M. Kotin (NIH, EUA). Para esto se diseñó un par de oligos mutagénicos, EGFP *Forward* 5'-AAGGAGGGATCCCATGGTGAG-3' y EGFP *Reverse* 5'-CGGCCGGGATCCTTG TACAG-3'. La secuencia de la posición -7 a la -2 del gen fue mutada de ATATAC a GGATCC para generar un sitio de restricción *Bam*HI en el extremo 5' y la secuencia de la posición 716 a la 722 fue mutada de GTAAAG a GGATCC para generar un sitio de restricción *Bam*HI en el extremo 3' y eliminar el codón de parada. El producto de PCR se clonó en el vector pCR8/GW/TOPO® TA (Invitrogen) y las colonias recombinantes se confirmaron por PCR con los oligos GW1 5'-GTTGCAACAAATTG ATGAGCAATGC-3' y

GW2 5'-GTTGCAACAAATTGATGAGCAATTA-3', para el posterior aislamiento del plásmido y digestión con la enzima de restricción *Bam*HI. Una vez aislado y purificado el gen de EGFP se hizo digestión de los vectores pFastBac-VPs con la enzima *Bam*HI y se ligó con el gen de EGFP en el extremo 5'. Para confirmar la correcta orientación del gen insertado se hizo perfil de restricción con la enzima *Nco*I y PCR con los oligos pFB *forward* y EGFP *reverse* por medio del cual se amplificó la secuencia correspondiente a EGFP. Después de confirmar la presencia y secuencia de EGFP en el vector de transferencia pFastBac, se procedió a generar el báculo recombinante y la transfección de las células Sf9 como se describió anteriormente.

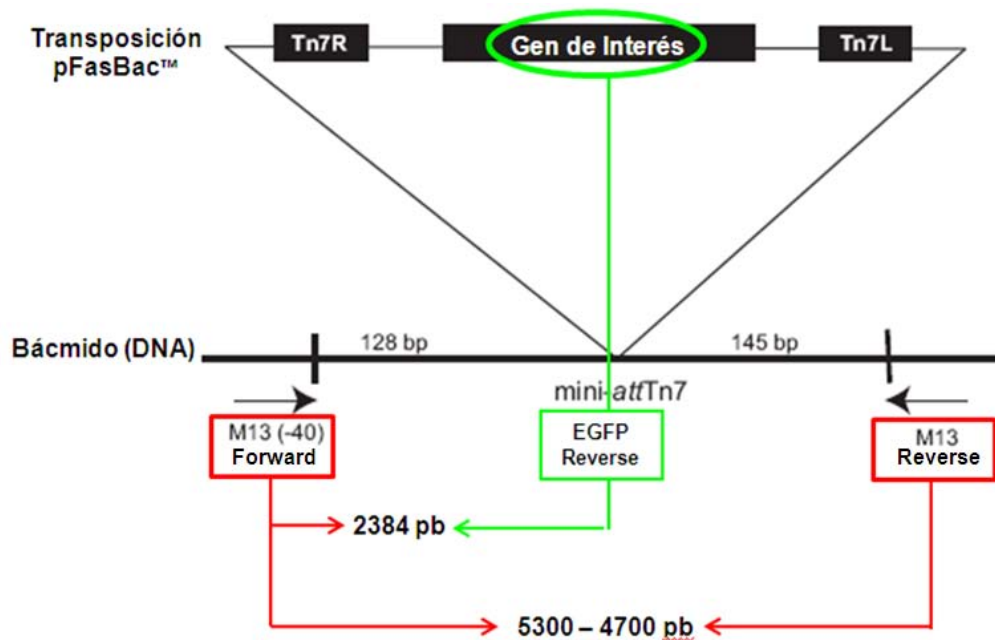


Figura 9. PCR para verificación del báculo recombinante.

Ensayo en placa para el aislamiento de placas virales

Se sembraron células Sf9 (con viabilidad mayor al 95%) en cajas de 6 pozos a una concentración de 1×10^6 cél/pozo en un volumen de 2 mL de medio de Grace sin SFB y se dejaron adherir por 1h a 27°C sin agitación. Se prepararon diluciones seriadas (10^{-2} a 10^{-6}) de los stocks virales en medio de Grace sin SFB y con antibióticos (Coctel SIGMA 100X). Posteriormente se retiró el medio y se agregaron 1 mL de las diluciones virales y se incubó 1h a 27°C. Al final del período de incubación se removió el inóculo de cada

pozo y se añadió una capa de 2 mL de medio de plaqueo (25 ml de medio Grace's 2X, 12.5 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 4%, 2.5 ml de SFB, 10 ml de agua estéril) a una temperatura de 37°C. Las cajas se incubaron a 27°C en ambiente húmedo por 5 días. Al concluir el período de incubación se añadió 1 mL por pozo de una segunda capa de agarosa (16.5 ml de medio Grace's 2X, 1.5 ml de solución de rojo neutro 1mg/ml, 6 ml de agarosa de bajo punto de fusión al 4%). Se incubó durante 4 h a 27°C en ambiente húmedo para posteriormente identificar las placas virales por la formación de halos incoloros en la capa de agarosa. La formación de dichos halos está relacionada con la presencia de células muertas (por efecto de la infección con baculovirus) que no retienen el colorante rojo neutro. Las placas se colectaron picando el agar con una pipeta Pasteur estéril y se resuspendieron en 500 µl de medio de Grace 1X con 0.5% de FBS.

Para seleccionar las placa viral a usar para obtener el stock viral para los ensayos de producción de las cápsides virales, se incubaron cajas de 6 pozos con células Sf9 en medio SF-900 II (1×10^6 cél/pozo en 2 mL) a 27°C por 1 h. Se eliminó el medio de cultivo, los pozos se infectaron con 0.1 mL de las placas seleccionadas mas 0.9 ml de medio y se incubó 1 h a 27°C sin agitación. Se añadieron 1.0 mL de medio SF-900 II por pozo y se dejaron incubando a 27°C por 5 días. Después de la incubación se cosechan las células y el sobrenadante para posteriormente evaluar la expresión de proteína recombinante por Western blot. El sobrenadante se almacenó a 4°C para posteriormente amplificar el *stock* viral y el *pellet* celular se lisó en 100 µl de buffer de lisis.

Producción de stocks virales de trabajo

Se infectaron 50 mL de células Sf9 en medio SF-900 II a una concentración de 0.75×10^6 cél/mL con 400 µL del sobrenadante recuperado de la infección de células Sf9 con la placa viral de cada baculovirus identificada como mejor productora de proteína recombinante. El sobrenadante se colectó por centrifugación a las 120 h y se almacenó a 4°C con 0.5% de FBS. Este nuevo stock viral se denominó *stock* pase 2 (Tabla 2).

La determinación de los títulos virales se realizó mediante la metodología desarrollada por Mena et al. (2003) descrita a continuación: Se utilizaron cultivos de células Sf9 en fase

exponencial con viabilidad mayor de 95%. En cajas de 96 pozos de fondo plano se sembraron 5×10^3 cél/mL en 50 μ L de medio SF-900 II. Se prepararon diluciones seriales de los stocks virales (1 a 1×10^{-10}) en medio SF-900 II y se añadieron 10 μ L/pozo. Se utilizaron 16 pozos por cada dilución (10 μ L/pozo) y 16 pozos como control sin infectar a los cuales se añadieron 10 μ L/pozo de medio SF-900 II sin virus. Seis días post-infección se añadieron 10 μ L/pozo de una solución stock (5 g/L) de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Las cajas se incubaron durante 2 h, se centrifugaron a 2000 g por 10 min, y se descartó el sobrenadante. Los cristales de sal se solubilizaron con 50 μ L de DMSO (dimetil-sulfóxido). Se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (modelo 550; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; USA). Los datos de absorbancia se ajustaron utilizando el paquete Sigmaplot (SPSS, Chicago IL, USA) a la siguiente ecuación de una curva sigmoide:

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{D}{D_0}\right)^b} \quad (\text{Ecuación 2})$$

donde Y es la absorbancia, Y_0 es la absorbancia mínima (concentración celular viable mínima detectada, 100% de respuesta), a es la absorbancia máxima (0% de respuesta), D es la dilución, D_0 es la dilución a la cual la respuesta fue del 50% ($1/\text{TCLD}_{50}$), y b es la pendiente. Por medio de la ecuación 3 se calculó la dosis letal media para cultivo celular ($\text{TCLD}_{50}/\text{mL}$), donde V es el volumen de la dilución viral añadida a cada pozo. La $\text{TCLD}_{50}/\text{mL}$ se utilizó para calcular la dosis de infección media ($\text{TCID}_{50}/\text{mL}$) tal como se muestra en la ecuación 4; a partir de este parámetro se determinó el título viral según se muestra en la ecuación 5.

$$\text{TCLD}_{50} / \text{mL} = \frac{1}{D_0 V} \quad (\text{Ecuación 3})$$

$$\log TCID_{50} / mL = 0.912(\log TCLD_{50} / mL) + 1.674 \quad (\text{Ecuación 4})$$

$$UFP = TCID_{50} / mL * 0.69 \quad (\text{Ecuación 5})$$

Tabla 2. Títulos virales de los stocks de trabajo

Baculovirus	Pase No	Títulos (ufp/ml)
Bac-VP1	P2	2.7 x 10 ⁸
Bac-VP2	P2	3.6 x 10 ⁸
Bac-VP3	P2	4.7 x 10 ⁸
Bac-EGFP-VP1	P2	7.6 x 10 ⁸
Bac-EGFP-VP2	P2	2.1 x 10 ⁹
Bac-EGFP-VP3	P2	1.6 x 10 ⁹

Análisis de la expresión de proteínas

Ensayo en microplaca por el método de Bradford

Para cuantificar proteína total en sobrenadante y pellet se colocaron 150 µL de una dilución 1:100 de cada una de las muestras en cajas de 96 pozos por triplicado y se le adicionó 50 µL de reactivo Bradford (Bio-Rad). Se preparó una curva estándar a partir de una solución de albúmina bovina (1 mg/ml) haciendo diluciones en un rango de 5 a 80 µg/mL, cada estándar por triplicado. Las muestras se incubaron durante 5 min y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (modelo 550; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; USA).

Western Blot

Se mezclaron 20 µg de proteína total con buffer de carga 4X (1 mL 0.5 mM Tris pH 6.8, 1.6 mL SDS al 10%, 200 µL azul de bromofenol al 0.2% p/v, 800 µL glicerol y 400 µL β-mercaptoetanol) y se hirvieron 10 min. Se corrieron en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12% usando buffer Tris-glicina (24.8 mM Tris, 0.192 mM glicina, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, pH 8.8). Posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, USA) en sistema húmedo a corriente constante de 250 mA durante 1 h usando buffer de glicina (192 mM glicina, 25 mM Tris, 20% metanol). Después, las membranas se incubaron 2 h en solución de bloqueo (PBS-Tween 20 al 0.1%, con leche descremada al 5%). Se llevó a cabo 1 lavado de 15 min y 2 lavados de 5 min con buffer PBS-Tween 20 al 0.1% (PBST). Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con los anticuerpos monoclonales de origen comercial para la detección de las detección de VP1, VP2 y VP3 (B1 cat. 61058 PROGEN), para la detección de solo VP1 y VP2 (A69 cat. 61057 PROGEN), para la detección de baculovirus se utilizó anti-AcNPV gp64 de baculovirus (FastPlax cat. 70814) y anti-GFP (Cat. 632375, BD), preparados a una dilución 1:1000 para los dos primeros, 1:10000 para anti-GP64 y 1:20000 para anti-GFP preparados en PBST. Se lavaron las membranas 1 vez por 15 min y 2 veces por 5 min. Se incubó por 2 h con anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories, no. cat. 074-1806) preparado a una dilución 1:2500 en PBST. Las membranas se lavaron tal como se ya se describió para finalmente revelar con carbazol (4.9 mL de carbazol a 8 mg/mL, 12 mL de buffer de acetatos 0.05 M pH5, 30 µL de peróxido de hidrógeno al 30%).

Espectrometría de masas

Para identificar algunas de las proteínas obtenidas a partir de la infección de las células Sf9 con los baculovirus recombinantes, se hizo electroforesis de lisado de *pellet* celular en geles de poliacrilamida, se identificaron y cortaron las bandas deseadas y se enviaron para su identificación a través de Cromatografía líquida acoplada a Espectrometría de Masas (electro spray/masas-masas) en la unidad de proteómica (IBT-UNAM). Las

proteínas fueron eluidas del gel y digeridas con tripsina. Los péptidos resultantes fueron entonces analizados.

Producción de partículas pseudovirales (PPVs) en el SCI-BV

Para la producción de las PPVs se sembraron células Sf9 en fase exponencial y con viabilidad mayor del 96% a una concentración de 1×10^6 células/mL, en matraces de 500 mL con 100 mL de volumen trabajo en medio SF-900 II libre de suero, incubados a 27°C en agitación a 115 rpm. Inicialmente se coinfectaron 50 ml de células Sf9 (0.75×10^6 cel/ml) con los baculovirus Bac-VP1, Bac-VP2 y Bac-VP3 a una MDI de 1:1:1 y 5:5:5, durante 72 horas a 27°C. Se cosecho el pellet y se resuspendieron las células en buffer de lisis (50mM Tris base, 2mM MgCl₂, 1X inhibidor de proteasas (SIGMA), pH 7.5), se realizaron tres ciclos de congelación en hielo seco y descongelación a 37 °C, se centrifugó a 650g durante 15 min y se recolectó el sobrenadante. Para la recuperación de las partículas ensambladas se realizaron gradientes isopícnicos de CsCl (0.39 g/mL) utilizando ultra-centrifugación a 36000 rpm durante 18h. Este método se basa en la formación de un gradiente de densidad (ρ) en el seno del líquido, donde las partículas suspendidas migran a la región del gradiente que posee su misma densidad. El gradiente se forma como consecuencia de la fuerza centrífuga, alcanzando la mayor densidad en el fondo del recipiente y la menor en la parte superior del líquido.

Posteriormente para el ensamblaje de PPVs con EGFP se realizaron coinfecciones donde se utilizó un baculovirus que codifica por una de las proteínas VP de fusión con EGFP y los otros baculovirus que codifican por las otras proteínas VP sin fusionar.

Medición del tamaño de las PPVs por dispersión dinámica de la luz

Cuando la luz interacciona con una molécula aislada, la onda electromagnética induce un dipolo en la molécula que oscila con la misma frecuencia de la luz incidente. Característico de un dipolo es la aceleración de la carga. Cuando una carga es acelerada, se emite energía en todas las direcciones dentro de un plano perpendicular a la línea de

aceleración. La energía emitida del dipolo oscilante, inducida por la interacción de la luz incidente con las moléculas es lo que se conoce como dispersión de la luz o “*scattered light*”. La dispersión dinámica de la luz (DLS), es una técnica usada para determinar el tamaño de las partículas mediante el análisis del movimiento Browniano de las partículas en suspensión y ha sido usada para caracterizar proteínas y nanopartículas con un amplio espectro de usos (Kato et al. 2009). La técnica utiliza una fuente de luz (láser) para iluminar la muestra y la luz dispersada es colectada en un detector posicionado en un ángulo fijo. Para realizar este análisis utilizamos el Zetasizer nano-ZS (MALVERN Instruments).

Cuantificación de PPVs por ELISA

Para saber cuántas cápsides había en cada una en las muestras recuperadas de los gradientes de CsCl, se cuantificó las cápsides ensambladas de VAA-2 mediante un ensayo de ELISA utilizando el kit comercial de PROGEN Biotechnik (Cat PRAVT, lote 0656). Este kit utiliza el anticuerpo monoclonal A20; el cual reconoce epítopes conformacionales formados por las proteínas VP ensambladas. Para descartar el reconocimiento inespecífico de proteínas VP desensambladas o pentámeros formados por las proteínas VPs, se evaluó como control negativo el extracto de pellet recuperado de la parte superior de los gradientes de CsCl, donde quedan las proteínas VP monoméricas o parcialmente ensambladas pero que no forman macroestructuras y no son reconocidas por el anticuerpo A20. Se generó una curva de referencia para las cápsides del VAA-2, con un estándar de cápsides puras de concentración conocida y en ésta se interpolaron los valores de absorbancia (450nm) de las muestras para determinar el número de cápsides/mL que teníamos por cada coinfección (Figura 10). Conociendo la concentración de cápsides pudimos ajustar el número de partículas a utilizar por cada célula en los ensayos de unión e internalización.

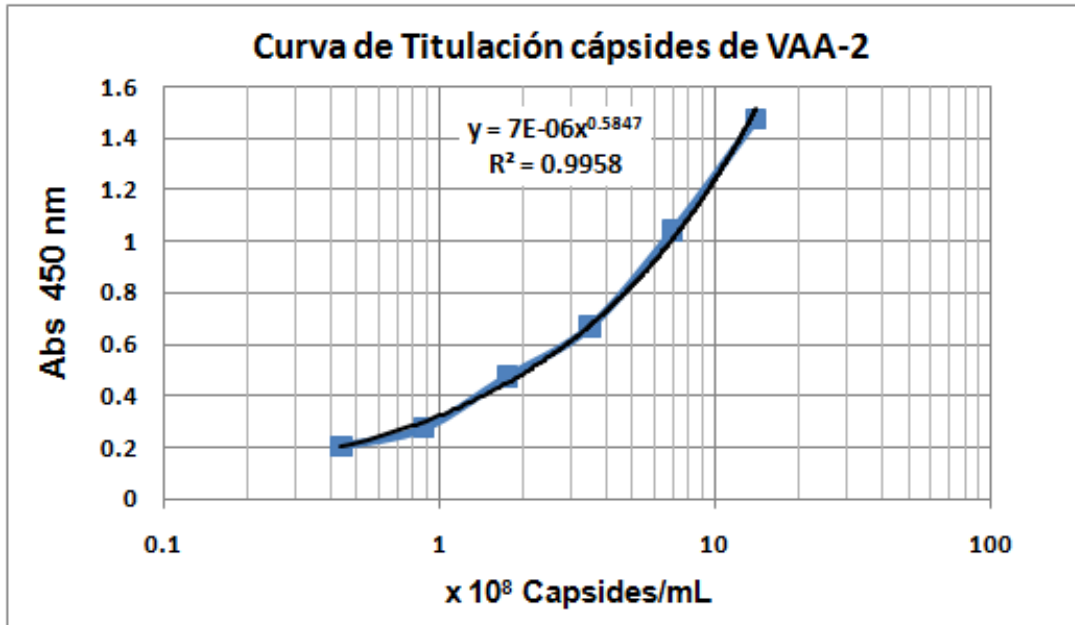


Figura 10. Curva estándar para la cuantificación por ELISA de cápsides de VAA-2. (■) diluciones seriales de cápsides puras de VAA-2; (—) regresión.

Microscopía electrónica de transmisión

Para evaluar la integridad de las PPVs obtenidas, se tomaron cada una de las muestras (2 µg de proteína total en 10 µL) y se prepararon por tinción negativa colocando 10 µL de la muestra sobre una rejilla de cobre 200 *mesh* cubierta con formvar/carbón (50ct). Se dejó fijar durante 5 min y se eliminó el exceso de muestra con un papel filtro, por contacto con el borde de la rejilla. Las muestras se contrastaron con 10 µL de acetato de uranilo al 1% por tres minutos, se retiró el exceso de uranilo y se lavaron con 10 µL de agua filtrada por 0.22 µm durante 1 minuto. Se eliminó el exceso de agua y se dejó secar a temperatura ambiente protegidas de la luz. Las muestras fueron evaluadas con un microscopio electrónico marca Joel JM1011, operado a 80 kV.

Microscopía de epifluorescencia y confocal

Para evidenciar la capacidad de unión de las PPVs a la membrana de las células HEK293T y su posterior internalización, se utilizaron *chamber slides* de 8 pozos (Lab-Tek®II, Cat 154941), donde se sembraron 20000 células/pozo en medio DMEM con 10% de suero fetal bovino (SFB) y se dejaron adherir por 24h a 37°C, 5% CO₂. Después de este tiempo las células se expusieron a las PPVs marcadas con EGFP, se dejaron interaccionar por diferentes periodos de tiempo y después se lavó cada pozo con 200 µl de PBS a 37°C para remover las partículas virales libres. Las células se fijaron con paraformaldehído al 2% por 15 min a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con PBS. Para la permeabilización se utilizó 200 µl de deoxicolato de sodio 0.2% en PBS por 15 min y se lavó 2 veces con PBS. Como control para la detección de las cápsides se utilizó 100 µl/pozo del anticuerpo A20 (Progen), el cual reconoce epítopes conformacionales en las partículas virales, a una dilución 1:50 en PBS y se incubó por 1 hora a 37°C. Como anticuerpo secundario se usó anti-raton Alexa fluor 585 (rojo, Invitrogen) para microscopía de fluorescencia o Alexa fluor 647 (rojo lejano, Invitrogen) para microscopía confocal a una dilución 1:100 y se incubó por 1 hora a 37°C protegido de la luz (Tabla 3). Para la tinción del núcleo se utilizó una solución de montaje la cual contiene DAPI o Ioduro de propidio (0.1 ng/µl), tratando las células previamente con RNAsa pues este último es inespecífico y se une al RNA citoplasmático. Las imágenes fueron colectadas con un microscopio de epifluorescencia marca Zeiss con sistema Apotome o en el microscopio confocal LSM510META (Zeiss, Jena, Alemania).

Tabla 3. Información de los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos y colorantes de DNA usados en ensayos de inmunocitoquímica

Anticuerpo	Marca	Número de Catalogo	Dilución	Especificidad	λ Excitación (nm)	λ Emisión (nm)	Espectro
Alexa fluor 647	Invitrogen	A31634	1:100	Anti-Raton	650	668	rojo lejano
Alexa fluor 568	Invitrogen	A11004	1:100	Anti-Raton	578	603	rojo
Ioduro de Propidio	SIGMA	81845	100 ng/µl	DNA/RNA	493	632	Rojo
DAPI (SlowFade® Gold antifade reagent)	Invitrogen	S36939	30 nM	DNA	358	461	Azul

Citometría de flujo

Para evaluar si existen diferencias en la capacidad de las diferentes PPVs producidas para interactuar con las células HEK293T, se sembraron 1×10^6 células/pozo en placas de 6 pozos en medio DMEM con 5% de SFB y se expusieron a 1×10^5 PPVs/célula durante 24h a 37°C, 5% CO₂. A las 24h las células se cosecharon, se lavaron con FACS buffer (PBS, SFB 2%, azida de sodio 0.026%) y se resuspendieron en 200 µL de paraformaldehído 2% en PBS durante 15 min a 4°C, protegidas de la luz. Las células se lavaron con 3 mL de saponina 0.1% en FACS buffer y se permeabilizaron durante 30 min con saponina 0.3% en FACS buffer a 4°C, se lavaron con 3 mL de saponina 0.1% en FACS buffer. Para la inmunodetección de las PPVs unidas a la membrana celular o internalizadas, se resuspendió el pellet celular en 200 µL de PBS con el anticuerpo primario (A20, Progen) en una dilución 1:100 en FACS buffer y se incubó durante 1h a 4°C. Las células se lavaron tres veces y se resuspendieron en 200 µL del anticuerpo secundario (anti-ratón acoplado a R-Ficoeritrina, Molecular Probes) en una dilución 1:1000. Las células se lavaron tres veces y se resuspendieron en 500 µL de FACS buffer para su posterior análisis en el citómetro de flujo FACSort (Becton-Dickinson, USA).

RESULTADOS

Construcción de los vectores de transferencia pFastBac-VPs

Para la producción de los baculovirus recombinantes que expresen las tres proteínas VP independientemente, los genes que codifican para las proteínas VP1, VP2 y VP3 de la cápside de VAA fueron extraídos de los vectores pVL-VPs (Ruffing *et al.*, 1992) por digestión con las enzimas *Bam*HI - *Xba*I (Figura 11). Más tarde, los genes individuales se subclonaron en el vector de transferencia pFastBac™1 (Invitrogen) bajo el promotor de poliedrina y flanqueados por los sitios de restricción *Bam*HI - *Xba*I (Figura 12).

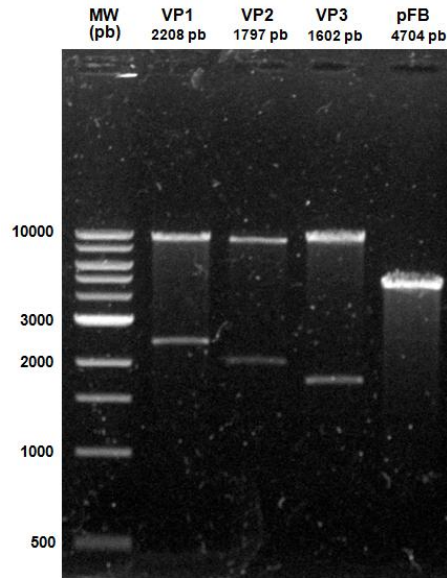


Figura 11. Digestión de los plásmidos pVL-VPs y pFastBac1 (pFB) con *Bam*HI-*Xba*I. (MW) marcador de peso molecular (ADN ladder 1Kb, NEB).

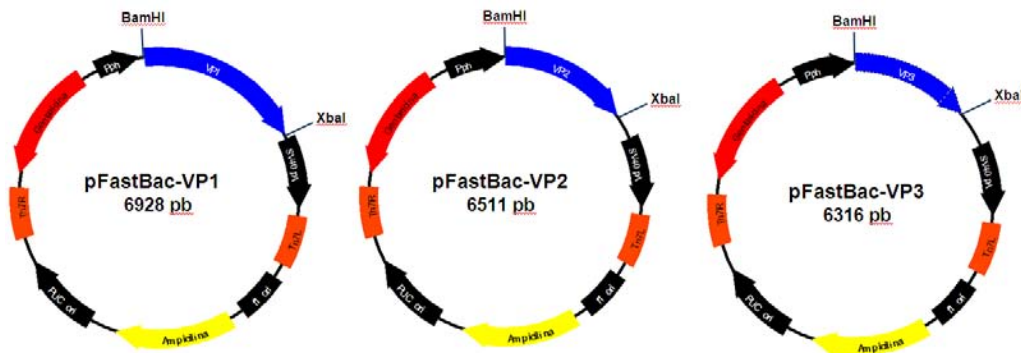


Figura 12. Vectores pFastBac-VPs

Para verificar la inserción de los genes VPs en el vector pFastBac™1 se realizó PCR de los vectores pFastBac-VPs con los oligos pFB y se secuenciaron los plásmidos con los mismos oligos. De las 12 colonias evaluadas para cada uno de los genes, tres fueron positivas para VP1, 6 para VP2 y 12 para VP3. Con los resultados de la secuenciación se verificó la identidad de los genes clonados con las secuencias reportadas en el GenBank para las proteínas VPs del VAA-2.

Producción de baculovirus recombinantes

Una vez verificada la presencia e identidad de los genes, se procedió a generar el báculo recombinante mediante la transformación de células competentes DH10Bac. Al darse la transposición sitio específica entre el vector de transferencia (pFastBac-VPs) y el vector lanzadera o “*Shuttle*” del baculovirus, se interrumpe el gen de la β -galactosidasa y con ello la producción de color azul. Se hizo PCR con los oligos M13 de las colonias blancas para verificar la presencia del gen recombinante. De las 4 colonias evaluadas por cada gen, 3 fueron positivas para VP1, 4 para VP2 y 3 para VP3 (Figura 13). De las colonias anteriores se seleccionaron 2 por cada gen y se hizo extracción del báculo para posteriormente transfectar células Sf9 para la producción de los baculovirus recombinantes.

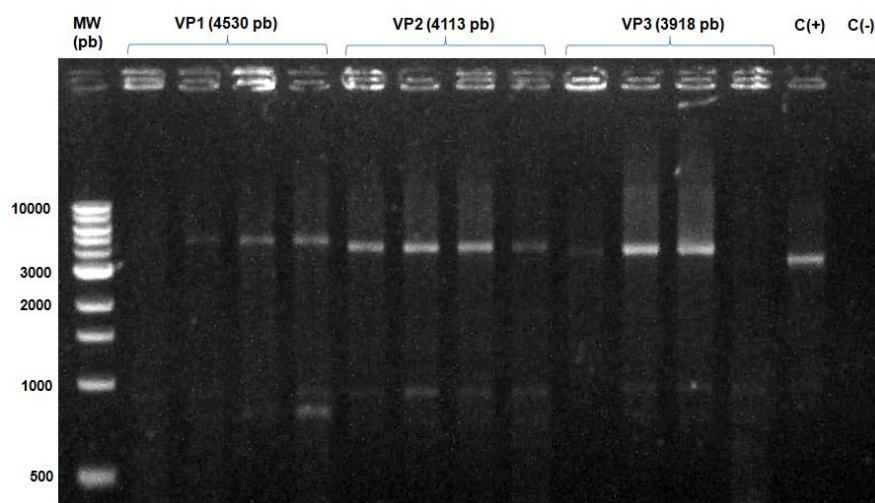


Figura 13. PCR de colonias DH10Bac recombinantes para los genes VP1, VP2 y VP3 de VAA-2. C(+) control positivo del PCR, báculo recombinante, C(-) control negativo de reacción.

Expresión de las proteínas VP del VAA-2

Para verificar la expresión de las proteínas recombinantes en las células Sf9 transfectadas con los b́acmidos recombinantes, se cosecharon las células a los 5 días de incubación, pues el propósito era obtener el mayor número de baculovirus recombinantes; se recuperó el sobrenadante y el *pellet* celular se lisó para el análisis mediante Western Blot (Figura 14).

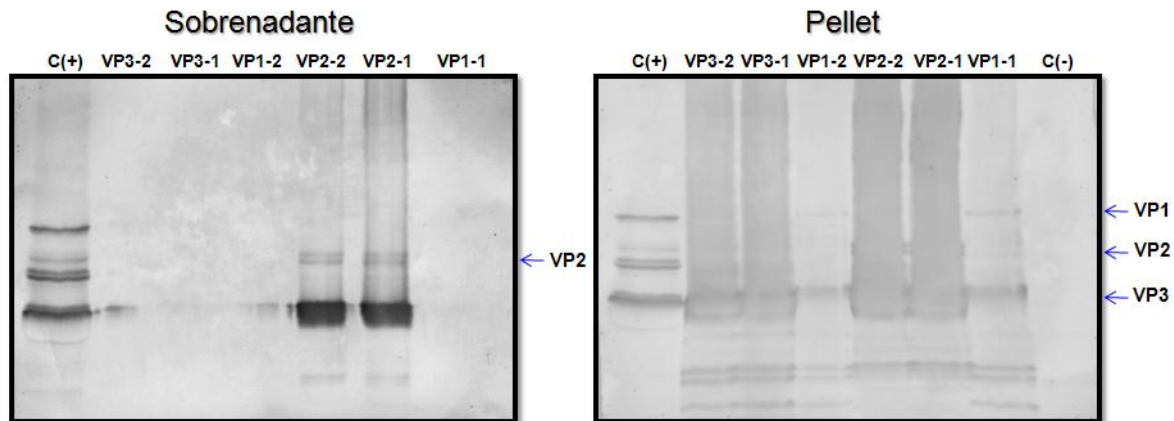


Figura 14. Western blot del sobrenadante y el pellet de células Sf9 transfectadas con los b́acmidos recombinante para cada una de las proteínas VP. Anticuerpo primario B1. C(+), control positivo, pellet de células infectadas con BacCap que codifica por las tres VPs.

En las dos muestras de sobrenadante evaluadas para VP2 se detectó la expresión de la proteína, observándose como una doble banda, pero también se observaron otras bandas de menor peso molecular, las cuales corresponden a productos de proteólisis o el uso alterno de codones para el inicio de la traducción, por lo que una de las bandas migro en el gel de igual forma que VP3 y fue detectada en el Western blot con el anticuerpo B1. En el trabajo de (Ruffing et al. 1992) quienes nos donaron los plásmidos que contenían los genes para la expresión independiente de las proteínas VP, también observaron esta banda del tamaño de VP3 y en estudios posteriores se observó que solo mutando las metioninas que estaban después del codón de inicio de VP3 se lograba eliminar la expresión de este polipéptido. La proteólisis puede ser el resultado de un tiempo de cosecha demasiado tardío, ya que las muestras evaluadas corresponden a 5 días de cultivo. En las muestras de pellet celular se detectó VP1, VP2 y VP3 en cada una

de las muestras evaluadas para cada baculovirus, sin embargo al igual que en las muestras de sobrenadante se observaron otras bandas de tamaños inferiores, sugestivas de proteólisis. Para verificar la correcta producción de las proteínas VP y determinar cuál es el mejor tiempo de cosecha de las células en donde no haya proteólisis, se realizaron cinéticas de producción de estas proteínas, donde se infectaron células Sf9 (0.75×10^6 células /ml) con los baculovirus recombinantes de cada proteína VP por separado a una MDI de 5 UFP/célula y se tomaron muestras desde las 18 horas hasta las 72h, donde la viabilidad de las células cayó por debajo del 30%. En la evaluación de la expresión de las proteínas por Western blot se observó que a las 24 horas hubo mayor producción de VP1 mientras que en tiempos posteriores solo se observó productos de proteólisis, para VP2 la mayor concentración también se alcanzó a las 24h y se mantuvo constante hasta las 56h y para VP3 la mayor concentración se alcanzó a las 48h (Figura 15). Para confirmar la identidad de las dos bandas que se producen en la infección con el Bac-VP2, se cortaron las bandas y se enviaron a la unidad de proteómica. Los péptidos identificados en cada una de las bandas fueron prácticamente los mismos, por lo cual no pudimos determinar cuál es la diferencia entre las dos bandas (Figura 15). Sin embargo, ambas bandas corresponden a VP2, por lo cual la banda de menor peso molecular puede ser producto de proteólisis o uso alternativo de codones de inicio de la traducción.

Construcción de las fusiones EGFP-VPs

Con el propósito de tener una proteína reportera que nos permitiera evaluar la composición de las cápsidas y visualizar su interacción con las células de mamíferos, las proteínas VP se fusionaron con EGFP en su extremo amino terminal, pues se ha observado que en esta posición no interfiere con el ensamblaje de las partículas virales (Lux et al. 2005). Para esto, una vez que se construyeron los vectores de transferencia pFastBac-VPs, se clonó el gen de EGFP en el extremo 5' de la región codificante de las VP para generar las fusiones EGFP-VPs. EGFP fue amplificado del plásmido pFBGFPR con la enzima Taq polimerasa (NEB), generando un sitio de restricción *Bam*HI en ambos extremos y eliminando el codón de término como se mencionó en materiales y métodos (Figura 17).

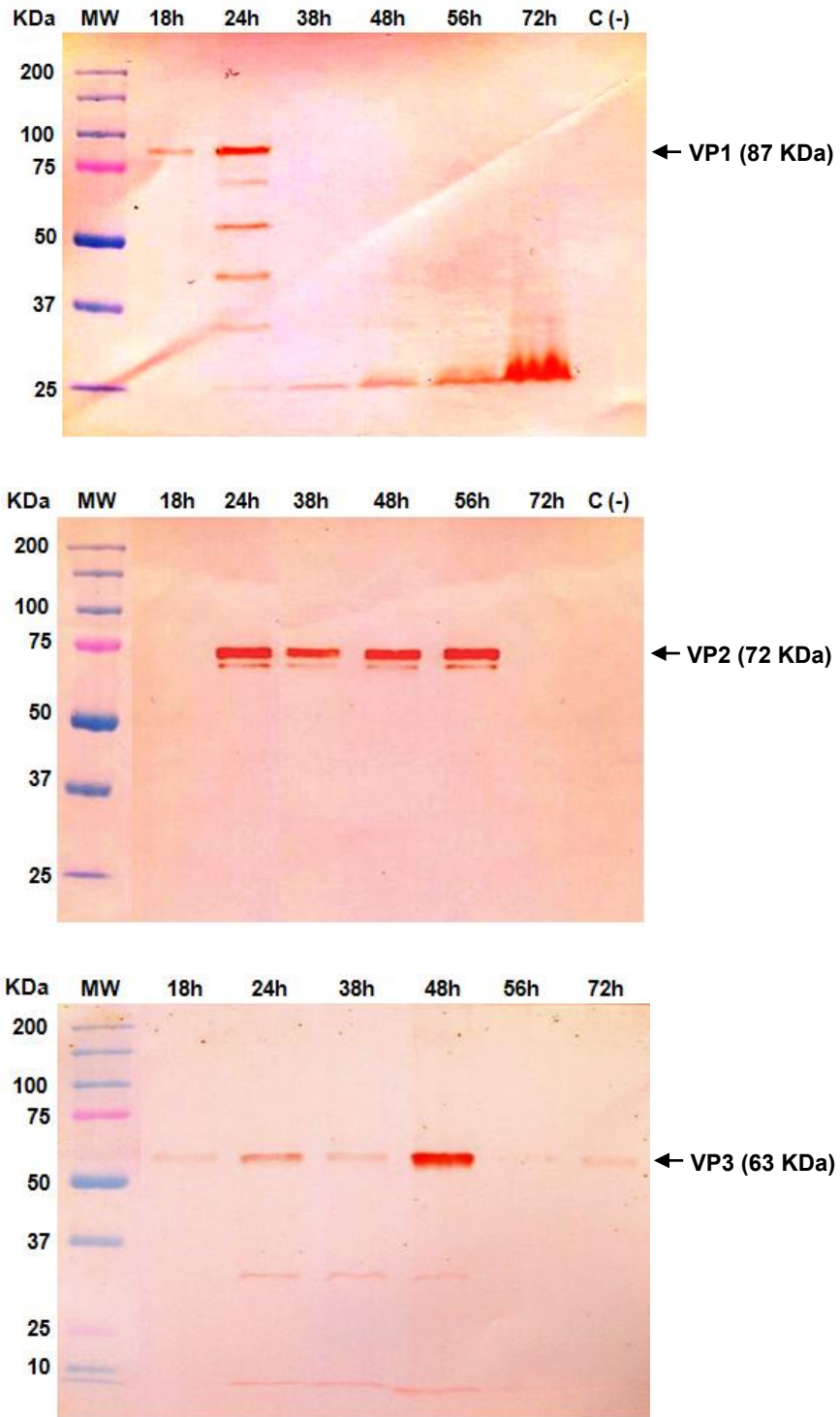


Figura 15. Cinéticas de expresión en células de insecto Sf9 de las proteínas VP del VAA-2, con el anticuerpo A69 para la detección de VP1 y VP2 y el anticuerpo B1 para la detección de VP3. KDa, kilodaltones; MW, marcador de peso molecular; C(-) control negativo, pellet de células infectadas con Bac-Rep que codifica por las proteínas no estructurales Rep.

```

VP2      MAPGKKRPFVEHSFVEPDSSSGTGKAGQQPARKRLNFGQTGDADSVPDFQPLGQPPAAPSG 60
VP2-B1  -----
VP2-B2  -----

VP2      LGTNTLATGSGAPMADNNEGADGVGNSSGNWHCDS TWMGDRVITT STRTWALPT YNNHLY 120
VP2-B1  -----TWALPT YNNHLY 12
VP2-B2  -----TWALPT YNNHLY 12
          *****

VP2      KQISSQSGASNDNHYFGYST PWGYFDNRFHCHFS PRDWQRLINNNWGF RPKRLNFKLFN 180
VP2-B1  K-----LINNNWGF RPK-LNFKLFN 31
VP2-B2  K-----LINNNWGF RPK-----LFN 27
          *                               ***** **

VP2      IQVKEVTQNDGTTT IANNLT STVQVFTDSE YQLPYVLGSAHQGCL PFPFADVFMVPOQGY 240
VP2-B1  IQVK----- 35
VP2-B2  IQVK----- 48
          ****

VP2      LTLNNGSQAVGRSSFYCLEY FPSQMLRTGNNTFFS YTFEDVPFHSSYAH SQSLGRIMNPL 300
VP2-B1  -----LMNPL 40
VP2-B2  -----SSFYCLEY FPSQMLRTGNNTFFS YTFEDVPFHSSYAH SQSLDRIMNPL 79
          *****

VP2      IDQYLYYLSRTNTPSGTTTQ SRLQFSQAGASDIRDQSRNWLPGPCYRQQRVSKT SADNNN 360
VP2-B1  IDQYLYYLS-----RLQFSQAGASDIRDQSR-----T SADNNN 73
VP2-B2  IDQYLYYLSRTNTPSGTTTQ SRLQFSQAGASDIR---NWLPG----- 129
          *****

VP2      SEYSWTGATKYHLNGRDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFGKQGSSEKTNVDIEKV 420
VP2-B1  SEYSWTGAT-----KFFPQSGVLIFG-----KTNVDIEKV 103
VP2-B2  -----RDSL VNPGPAMASHKDDEEKFFPQSGVLIFG-----KV 154
          ***** **

VP2      MITDEEEIRTTNPFVATEQYGSVSTNLQRGNRQAATADVNTQGVLP GMVWQDRDVYLQGP I 480
VP2-B1  MITDEEEIRTTNPFVATEQYGSVSTNLQR----- 131
VP2-B2  MITDEEEIRTTNPFVATEQYGSVSTNLQR--QAATADVNTQGVLP GMVWQDRDVYLQGP I 199
          *****

VP2      WAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLKHP PPQIL---IKNTFVPANPSTTF SAAKFAS FITQYS 537
VP2-B1  -----HP PPQIL---IKNTFVPANPSTTF SAAK----- 156
VP2-B2  WAKIPHTDGHFHPSPLMGGFGLK-----NTFVPANPSTTF SAAK----- 250
          *****

VP2      TGQVSVIEIWE LQKENS KRWNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTRYLTRN 597
VP2-B1  -----WNPEIQYTSNYNK----- 169
VP2-B2  -----WNPEIQYTSNYNKS VNVDFTVDTNGVYSEPRPIGTR----- 286
          *****

```

Figura 16. Resultados de espectrometría de masas de las dos bandas correspondientes a VP2. VP2, secuencia de aminoácidos de la proteína VP2 del VAA-2; VP2-B1, péptidos identificados de la banda 1; VP2-B2, péptidos identificados de la banda 2.

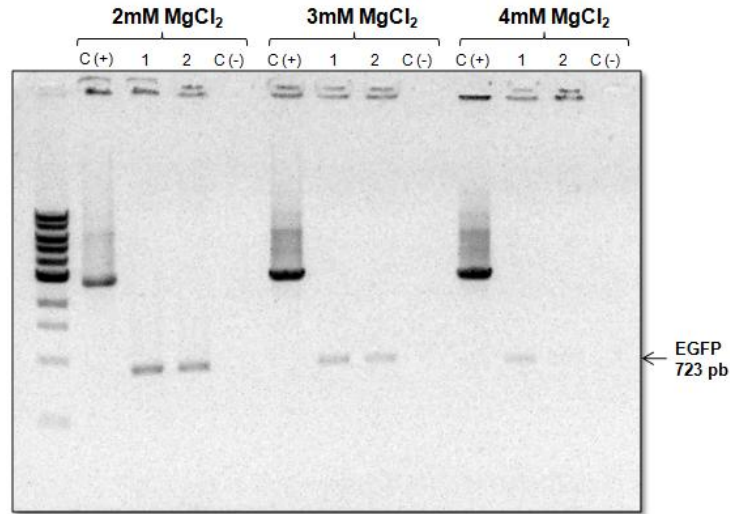


Figura 17. Estandarización del PCR para EGFP con los oligos mutagénicos.

Para incrementar la eficiencia de digestión con la enzima *Bam*HI, el gen de EGFP fue clonado en el vector pCR8/GW/TOPO[®] TA (Figura 18) y se transformaron *E.coli* competentes. Después de confirmar las colonias recombinantes mediante PCR con los oligos GW1 y GW2, se hizo extracción del plásmido y se hizo la digestión tanto de este plásmido como de los vectores pFastBac-VPs con la enzima *Bam*HI por 2 horas a 37°C, para posteriormente purificar los fragmentos de interés a partir de gel de agarosa al 1% (Figura 19) y realizar la ligación a 12°C por 16 horas.

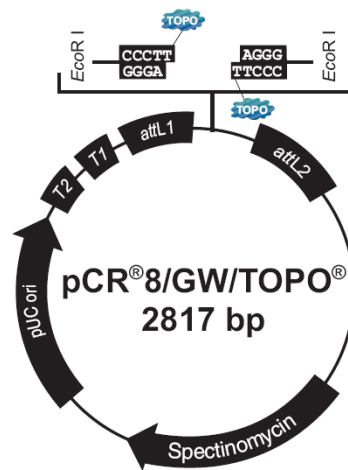


Figura 18. Vector pCR8/GW/TOPO[®] TA

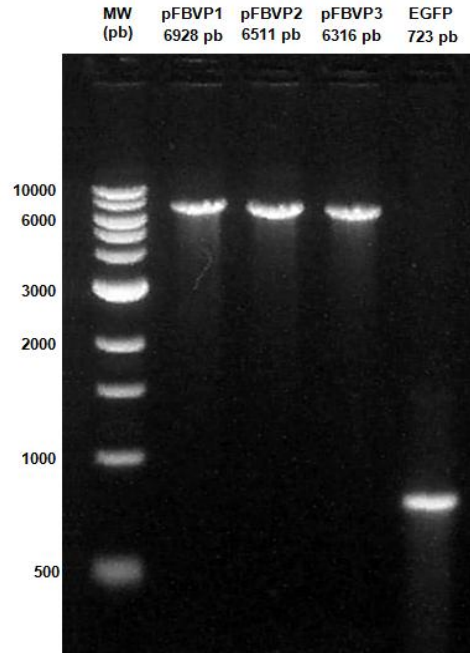


Figura 19. Digestión pCR8-EGFP y pFastBac-VPs con *Bam*HI.

Las colonias recombinantes para los vectores pFB-EGFP-VPs se verificaron por PCR con los oligos pFB. Una vez que se seleccionaron las colonias positivas para las fusiones, se verificó la correcta orientación de EGFP en los vectores pFB-EGFP-VPs mediante la digestión del plásmido con la enzima *Nco*I a 37°C por 2 horas y PCR con los oligos pFB *forward* y EGFP *reverse* (Figura 20). Posteriormente se seleccionó uno de los plásmidos por cada fusión y se enviaron a secuenciar con el oligo pFB *forward*. El análisis de los resultados confirmó la correcta orientación de los genes y su secuencia.

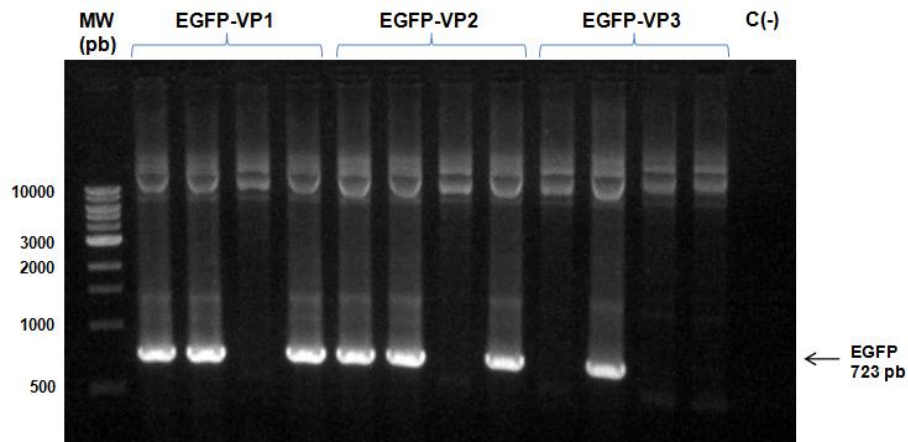


Figura 20. PCR de plásmidos pFB-EGFP-VPs con los oligos pFB *forward* y EGFP *reverse*.

Después se procedió a generar el báculo recombinante mediante la transfección de células competentes DH10Bac y su verificación mediante PCR con los oligos M13 *forward* y EGFP *reverse* (Figura 9). Posteriormente se purificó el báculo y con éste se transfectaron células Sf9. A las 48 horas de cultivo, las células empezaron a fluorescer y a las 96h de cultivo se observó que la mayoría de las células estaban expresando EGFP (Figura 21). Sin embargo, se dejaron hasta las 120h donde se cosechó el sobrenadante, ya que el propósito de este experimento era la producción de baculovirus recombinantes.

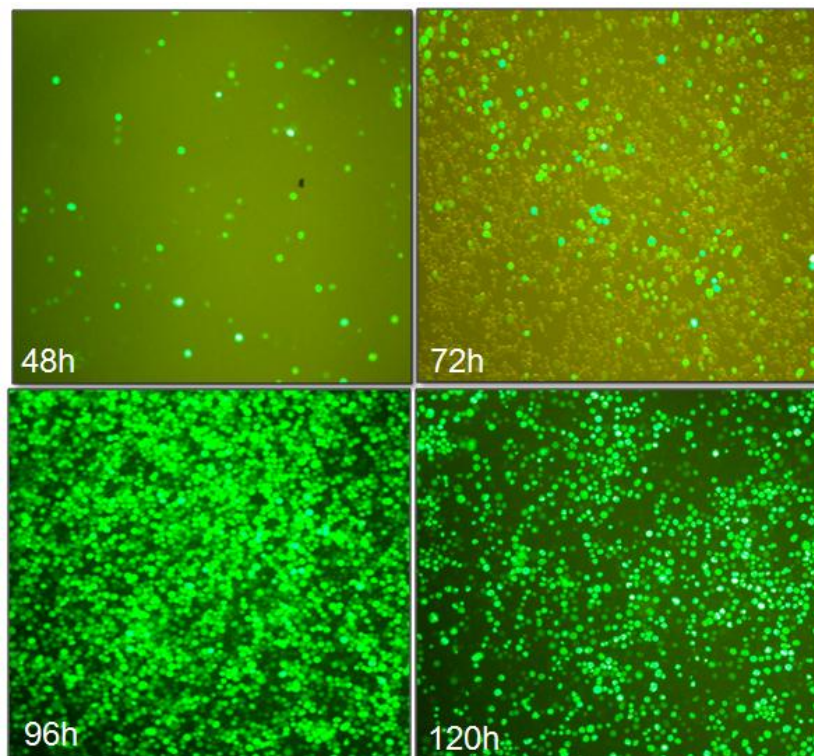


Figura 21. Cultivo de células Sf9 transfectadas con el báculo de EGFP-VP1, para la producción de los baculovirus recombinantes.

A los 5 días de cultivo, donde se espera la mayor producción de baculovirus, se cosecharon las células y la expresión de las proteínas VP y EGFP se verificó en las muestras de pellet celular por Western Blot con los anticuerpos B1 y anti-GFP (Figura 22). Al utilizar el anticuerpo anti-VPs (B1) se detectó la expresión de las proteínas VP en ambas muestras evaluadas para la fusión EGFP-VP1, pero solo en la muestra EVP1B se detectó una banda que corresponde al tamaño esperado para la fusión (114 KDa); sin

embargo, en ambas muestras se observaron otras bandas de menor peso molecular, las cuales corresponden a productos de proteólisis de las fusiones. Con el anticuerpo anti-GFP se logró detectar la expresión de EGFP en todas las muestras evaluadas para las tres fusiones, pero al igual que con el anti-VPs se observaron otras bandas de diferentes pesos moleculares no observadas en el control negativo, las cuales corresponden a proteólisis. En el control negativo (pellet de células infectadas con Bac-Rep que codifica por las proteínas no estructurales Rep) se detectaron algunas bandas inespecíficas con el anticuerpo anti-GFP, lo cual sugiere que la concentración del anticuerpo usada (1:2500) no fue la adecuada, por lo cual en los próximos experimentos se utilizó a una dilución mayor (1:20000).

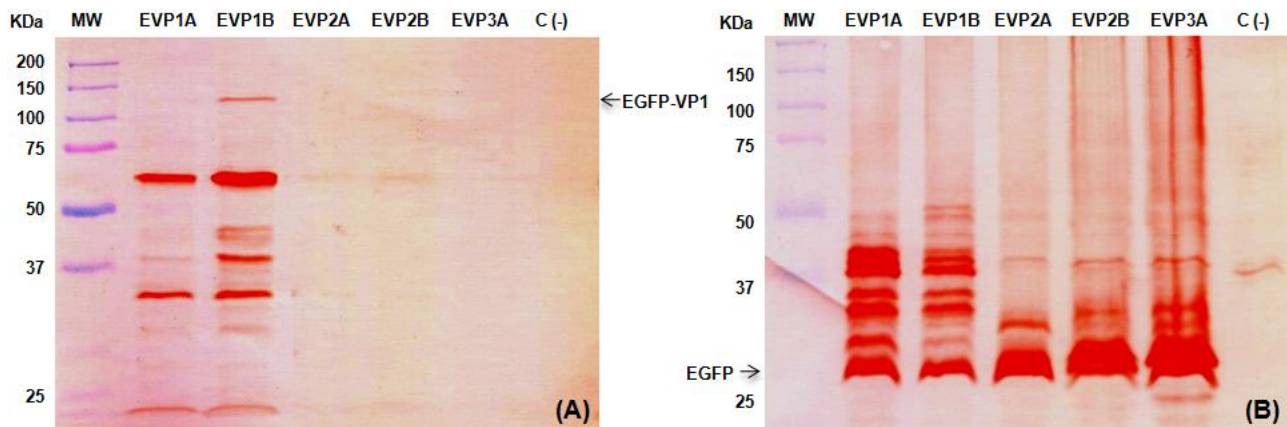


Figura 22. Western Blot con el anticuerpo B1 (A) y anti-GFP (B) de células Sf9 transfectadas con los bácmidos recombinantes que codifican para las fusiones EGFP-VPs. C(-) control negativo, células infectadas con Bac-Rep.

Para descartar que la falta de expresión de las fusiones EGFP-VP2 y EGFP-VP3 se debe a un problema a nivel transcripcional donde no se está sintetizando el mensajero completo de cada una de las fusiones, se infectaron células Sf9 con los baculovirus producidos en la transfección de células con el bácmido y a las 48 horas de cultivo, cuando las células estaban fluoresciendo, se cosecharon y se hizo extracción del RNA con el kit de FERMENTAS RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis (Cat K1632) con el oligo APT18 5'-GGCCACGCGTCTCGACTAGTACTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3', para posteriormente hacer RT-PCR para evaluar el transcrito de las fusiones con los oligos

GFP *forward* 5'-GGGCACAAGCTGGAGTACA-3' Y AUAP *reverse* 5'- GGCCACGCGTCG ACTAGTAC-3' (Figura 23).

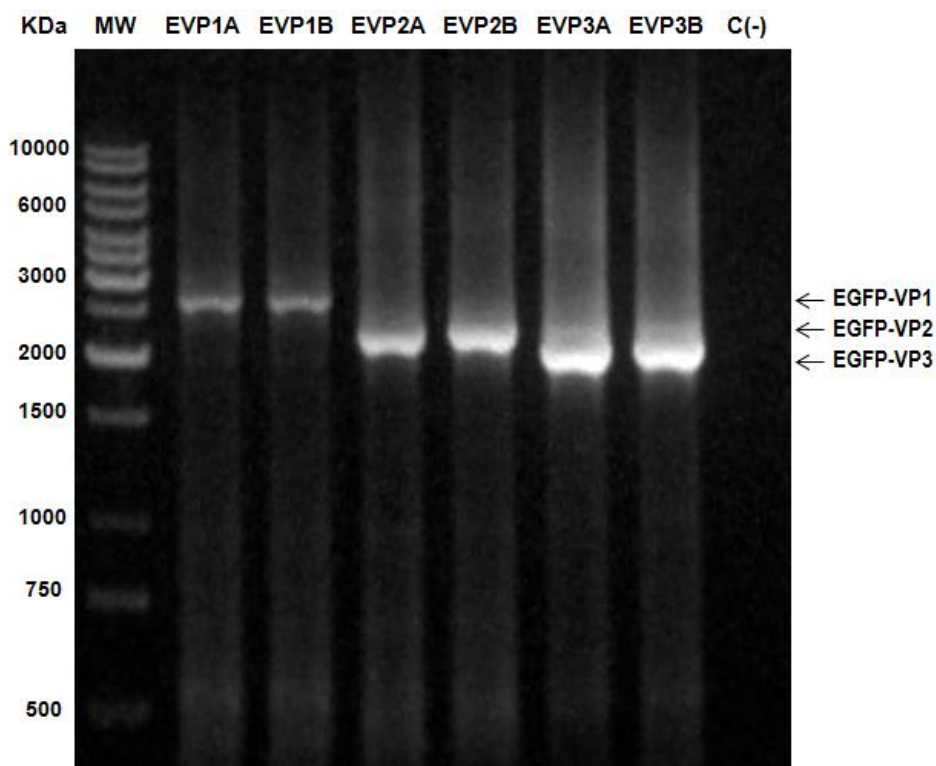


Figura 23. RT-PCR de células Sf9 infectadas con los baculovirus recombinantes de cada una de las fusiones. EGFP-VP1 ORF 2563 pb; EGFP-VP2 ORF 2146 pb; EGFP-VP3 1951 pb; C(-) control negativo RNA de células sin infectar.

En todas las muestras evaluadas hubo amplificación por RT-PCR, para las muestras de EGFP-VP1 se amplificó una banda del tamaño esperado para el transcrito de 2563 pb, para las muestras de EGFP-VP2 también hubo amplificación del tamaño esperado de 2146 pb y para las muestras de EGFP-VP3 igualmente ambas muestras produjeron amplicones del tamaño esperado para la fusión EGFP-VP3 de 1951 pb. Para confirmar la correcta transcripción de los genes que codifican por cada una de las fusiones, los productos de RT-PCR correspondientes a las muestras EVP1B, EVP2B y EVP3A se enviaron a secuenciar y los resultados obtenidos confirmaron que las secuencias para las fusiones EGFP-VPs se están transcribiendo correctamente, lo cual sugiere que la falta de producción de las fusiones EGFP-VP2 y EGFP-VP3 se debe a un problema traduccional.

Para descartar que el problema en la traducción de las fusiones se debiera al *linker* entre EGFP y las VP, pues para EGFP-VP1 fue de 5 aminoácidos (DPKSG) mientras que para EGFP-VP2 y EGFP-VP3 fue de solo 3 aminoácidos (DPH), se decidió construir dos nuevos baculovirus para las dos últimas fusiones, pero que tuvieran un *linker* más largo. Para esto se diseñó un nuevo oligo mutagénico para el extremo 3' de EGFP (EGFP rev#2 3'-TCATATCGCCCCTAGGCGTGT-5') con el cual se mutagenizó el codón de término y se movió el sitio de restricción en el extremo 3' del gen para que al hacer la digestión con *Bam*HI y ligar con los vectores de transferencia pFastBac-VPs que ya se habían construido, se generara un *linker* de 6 aminoácidos (YSGDPH). Una vez se obtuvo mediante PCR el nuevo inserto de EGFP se clonó en el vector pCR8/GW/TOPO[®] TA y se hizo la digestión, ligación y construcción de los nuevos bácmidos recombinantes como se mencionó previamente para las otras fusiones. Una vez confirmados los bácmidos por PCR se procedió a transfectar las células Sf9, las cuales empezaron a fluorescer desde las 48h. A los 5 días se cosecharon los sobrenadantes y el pellet de células se lisó para evaluar la producción de las fusiones mediante Western blot, donde no se pudo detectar la expresión en ninguna de ellas con el anticuerpo B1 (VP1, VP2, VP3). Para evaluar si realmente no había producción de las fusiones EGFP-VPs o si era que no se estaba detectando con el anticuerpo B1, se montó un gel de agarosa al 0.5% para evitar la desnaturalización de las proteínas y la pérdida de fluorescencia de EGFP, en este gel se cargo la proteína EGFP como control positivo y el lisado de pellet de las fusiones y se evaluó en el transiluminador de UV a 365 nm. Se observó por medio de la fluorescencia de EGFP que las fusiones migraron menos en el gel que EGFP, lo cual sugiere que se estaba produciendo EGFP fusionada con las VPs, lo cual hacia que migrara más lento en el gel de agarosa.

Posteriormente se realizó el plaqueo de los baculovirus de las fusiones como se describió anteriormente y se evaluó la producción de las fusiones con cada placa viral mediante Western blot para seleccionar el baculovirus con el cual se generó el stock de trabajo pase 2 (Figura 24). Para las muestras de EGFP-VP1 se detectó la producción de la fusión con las 5 placas evaluadas con el anticuerpo B1, sin embargo también se observaron otras bandas correspondientes a la proteólisis ya observadas en evaluaciones anteriores.

Para las muestras de EGFP-VP2 y EGFP-VP3 no se detectaron las fusiones en ninguna de las muestras con el anticuerpo B1, pero con el anticuerpo anti-GFP si se detectaron en todas las muestras evaluadas. Con estos resultados se confirmó que en la infección de células de insecto con los baculovirus recombinantes se logro la expresión de cada una de las proteínas VP del VAA-2 fusionadas con EGFP.

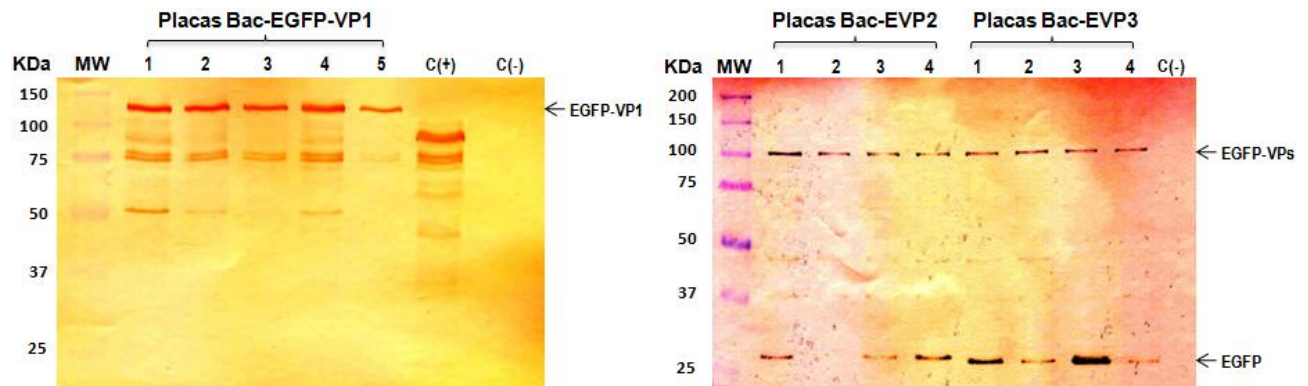


Figura 24. Western blot de lisado de pellet de células Sf9 infectadas con los baculovirus de las fusiones EGFP-VPs. C(+) control positivo. C(-) control negativo, células infectadas con Bac-Rep. Anticuerpo B1 para la fusión de EGFP-VP1 y anti-GFP para EGFP-VP2 y EGFP-VP3

Purificación de las Partículas Pseudovirales

Para la estandarización del método de purificación de las PPV nos basamos en el método de purificación de partículas virales de VAA descrito por Smith et al. (2008). Se utilizó una cromatografía de intercambio aniónico, la cual separa moléculas cargadas basándose en la interacción electrostática entre las moléculas de interés y un grupo ionizado incorporado dentro de una matriz o resina, que para nuestro caso este grupo es una amina cuaternaria con carga positiva (Q Sepharosa). Las moléculas o proteínas con carga negativa que se unen a la resina son eluidas por un aumento de la fuerza iónica de la fase fluida al aumentar la concentración de sal (NaCl). Las muestras de lisado de pellet se cargaron en la columna con el buffer A (20 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, pH 6.0) a un flujo de 2 mL/min. Una vez que todas las proteínas o moléculas que no se unieron a la resina salieron de la columna (Figura 25A, P0), se procedió a eluir las partículas que si se unieron, entre ellas el VAA que por tener una carga negativa a pH 6.0 interacciona con la

resina, quedando retenida. Para eluir el VAA se aumentó la fuerza iónica por medio de un gradiente de 0 a 50% del buffer B (20 mM Tris-HCl, 1 M NaCl, pH 6.0) en un tiempo de 10 minutos (Figura 25A, P1, P2 y P3). Se recolectaron las fracciones que eluyeron y se concentraron con el sistema de filtración Amicon de 100 KDa (Millipore). Mediante Western blot con el anticuerpo B1, que reconoce las tres VPs, se confirmó que en el pico 1 se encuentran las PPV de VAA, aunque sólo se detectaron VP1 y VP3, al igual que en la muestra de lisado del pellet antes de inyectar en el equipo, probablemente debido a la poca sensibilidad observada con el nuevo lote del anticuerpo B1 (Figura 25B).

Después de confirmar que en el pico 1 del intercambio aniónico se encuentran las PPV, se utilizó esta muestra para proceder a realizar la cromatografía de exclusión el gel, la cual separa moléculas o partículas de acuerdo a su tamaño a través de la difusión diferencial dentro de una matriz con un tamaño de poro definido. Las moléculas con un tamaño superior al diámetro de los poros de la matriz van a quedar excluidas de esta y migrarán más rápido dentro de la columna, mientras que las moléculas con tamaño inferior al tamaño del poro entrarán en ellos, por lo cual tendrán que recorrer un camino más largo para salir de la columna. Aunque los VAA son de los virus de ADN más pequeños, las partículas virales son más grande que la mayoría de las proteínas celulares y proteínas virales no ensambladas (VAA 3.6×10^6 Da), por lo cual quedarán excluidos de la matriz y eluirán en el volumen muerto de la columna, mientras que las otras moléculas lo harán más tarde. Para esto se utilizó la resina HW-65F con un intervalo de exclusión $4 \times 10^4 - 5 \times 10^6$ Da, a un flujo de 3 mL/min. Se observó la elución de cuatro picos, los cuales se colectaron y concentraron con Amicon de 100KDa. Mediante un gel de poliacrilamida tenido con coomassie se confirmó que las PPV de VAA eluyeron en el pico 2 (Figura 26). En esta muestra se observan las tres VPs, sin embargo también se observan otras bandas de tamaño inferior a VP3, lo cual atribuimos a productos de degradación o proteólisis de las VPs.

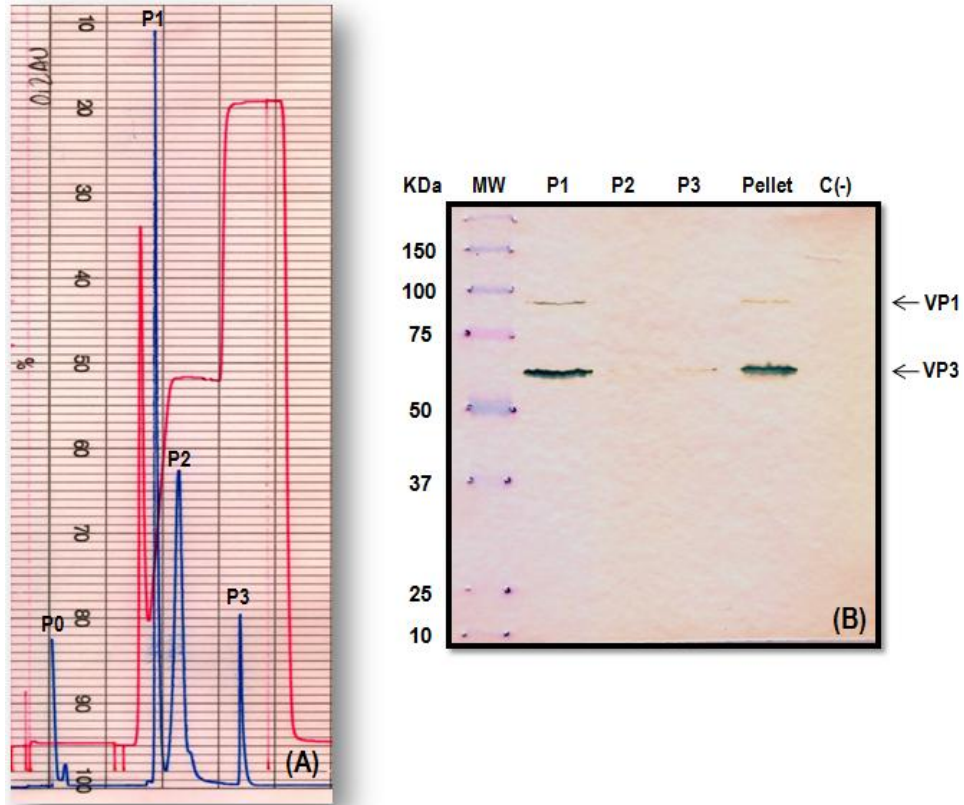


Figura 25. Cromatografía de intercambio aniónico. (A) cromatograma, P0, pico 0 antes del gradiente; P1, pico 1 durante el gradiente; P2, durante el gradiente; P3, después del gradiente (100% del buffer B). (B) Western blot con el anticuerpo B1 de las fracciones recuperadas.

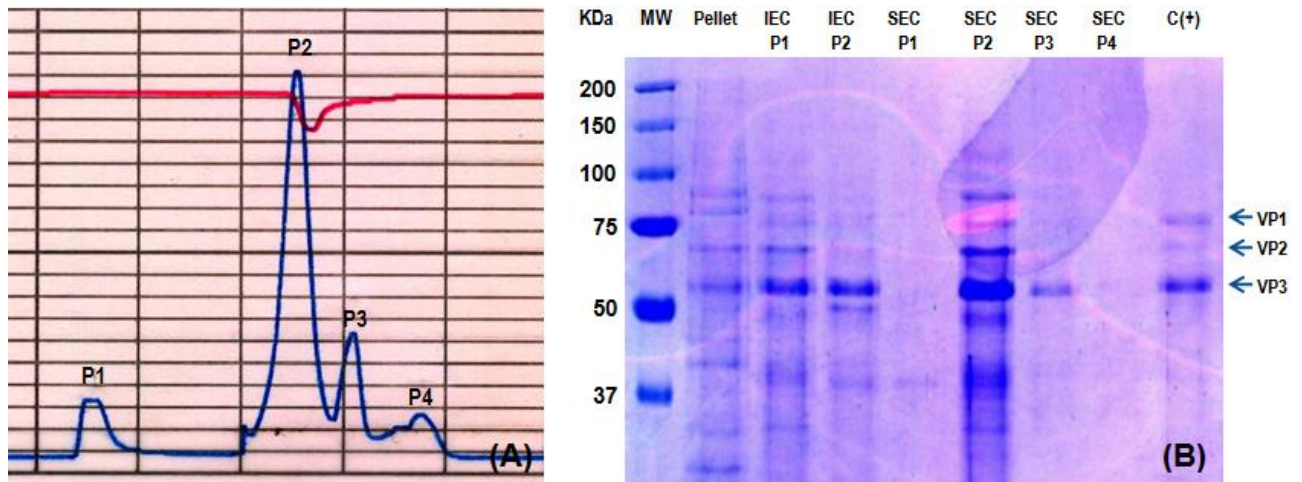


Figura 26. Cromatografía de exclusión en gel. (A) Cromatograma. (B) gel de poliácridamida teñido con coomassie. IEC, cromatografía de intercambio aniónico; SEC cromatografía de exclusión en gel; C(+), control positivo de cápsidas de VAA-2 puras. P1, P2, P3 y P4 picos recuperados.

Para verificar si durante el proceso de purificación de las PPV por cromatografía de intercambio aniónico y exclusión en gel, se eliminó la contaminación por baculovirus que se producen durante el proceso de infección, se realizó Western blot con el anticuerpo anti-GP64 el cual reconoce la glicoproteína GP64 del baculovirus (Figura 27). Se observó que después de la purificación por cromatografía de intercambio aniónico ya no se detecta la presencia de GP64, mientras que en las muestras de lisado de pellet celular antes de inyectar en la columna si está presente.

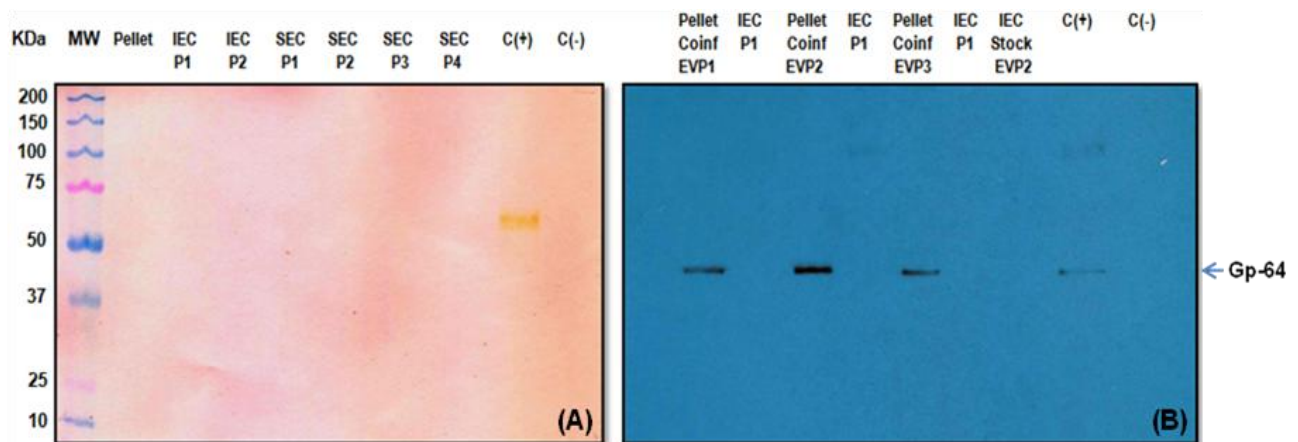


Figura 27. Western blot con anti-GP64. (A) Muestras de la confección con los tres Bac-VPs (B) muestras de las coinfecciones con los Bac-VPs y los Bac-EGFP-VPs. IEC cromatografía de intercambio aniónico, SEC cromatografía de exclusión en gel, C(+) control positivo lisado de células infectadas con Bac-EVP3, C(-) control negativo lisado de células sin infectar.

Análisis de las PPV purificadas por HPLC

En nuestro laboratorio (Fabian-Macedo 2007) desarrolló un método para el análisis y cuantificación de pseudo-partículas del antígeno de superficie de Hepatitis B (AgshB) con diámetro de 20-27 nm y Mena et al., (2005), para partículas pseudovirales de rotavirus de 70 nm utilizando HPLC de exclusión en gel, donde es posible discriminar estas macroestructuras del resto de la proteína de extractos celulares y otros contaminantes. Con base en esto consideramos factible implementar un método de análisis de las PPV de VAA producidas en este trabajo, usando cromatografía de exclusión en gel. Para esto se utilizó un sistema con una precolumna seguido de dos columnas Ultrahidrogel 2000 (200nm) y Ultrahidrogel 500 (50nm) conectadas en serie. Antes de proceder a analizar las

muestras es necesario caracterizar el sistema analítico, para lo cual se genera una curva estándar con proteínas globulares de radio hidrodinámico (R_H) conocido: EGFP (2.4 nm), albúmina (3.55 nm), IgG (5.3 nm), tiroglobulina (8.5 nm) y nanoesferas fluorescentes “FluoSpheres” de 24 nm y 40 nm (Invitrogen, EUA). En este trabajo se analizaron los perfiles cromatográficos de las proteínas EGFP, tiroglobulina y las nanoesferas de 40 nm, obteniéndose una buena correlación entre el tiempo de elusión y su radio hidrodinámico (Figura 28).

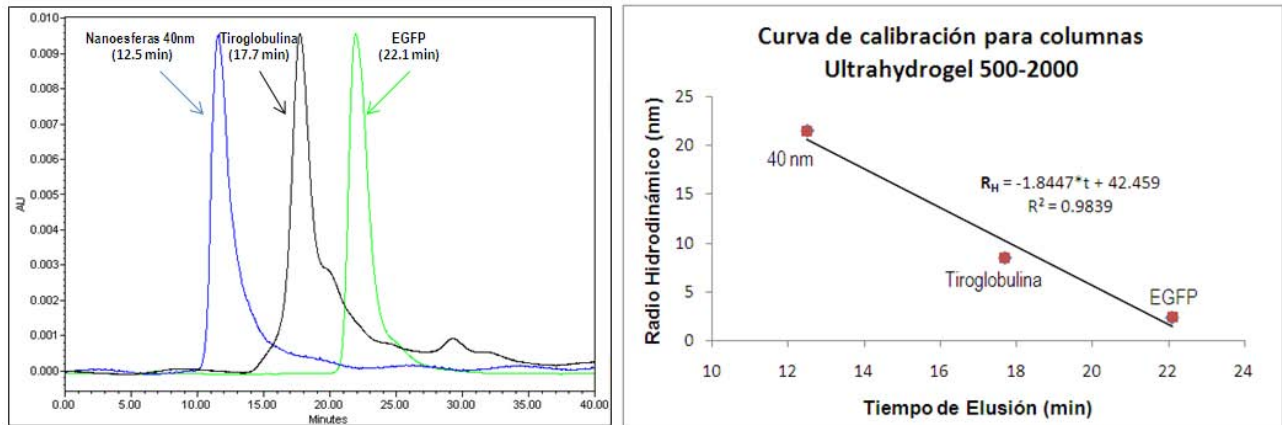


Figura 28. Cromatograma de la curva de calibración para HPLC. AU unidades de absorbancia.

Una vez obtenida la curva estándar parcial, se procedió a inyectar las muestras para su caracterización (Figura 29). Esta caracterización tuvo como objetivo determinar los tiempos de elusión de las partículas de VAA para establecer el intervalo de recolección de las fracciones de elusión en las muestras y evaluar la pureza de las muestras obtenidas por gradiente de CsCl. De acuerdo al diámetro del VAA (25 nm), se esperaba obtener partículas ensambladas entre el intervalo de elusión de 15 a 17 minutos, mientras que a tiempos menores eluirían los agregados de partículas presentes en muestras concentradas. A pesar de que no se observa un pico diferenciado de los demás en el tiempo calculado para las PPV del VAA (16.2 minutos), si se observa un incremento en la absorbancia en ese tiempo, sugiriendo que en la muestra si hay partículas ensambladas pero en su identificación interfieren otros contaminantes. Con esto se corrobora que a pesar de que con los gradientes de CsCl se obtiene PPV, la pureza de la muestra es baja. La señal de absorbancia en las dos muestras analizadas inició a los 12 min y se extendió hasta más de 25 min, donde posiblemente corresponde a proteína degradada.

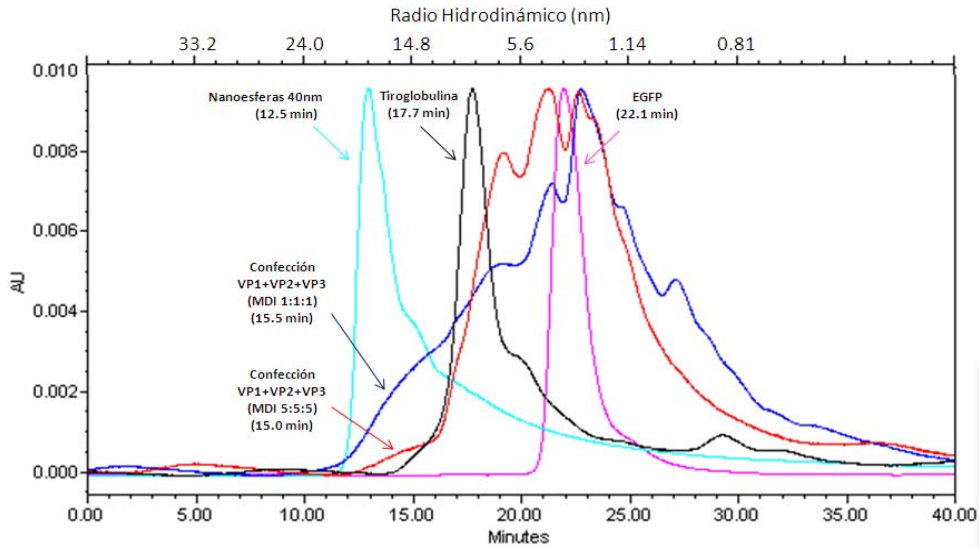


Figura 29. Perfil cromatográfico de muestras de gradientes de CsCl, usando las columnas Ultrahydrogel 2000 y Ultrahydrogel 500 en serie con pre-columna y buffer de fosfatos 10 mM a pH 8.0. AU, unidades de absorbancia.

Producción de partículas pseudovirales en el SCI-BV

En los gradientes de CsCl de las coinfecciones con los baculovirus recombinantes de las proteínas sin fusionar (Bac-VP1, Bac-VP2 y Bac-VP3) se obtuvieron bandas de densidad cercana a la reportada para VAA ($\rho = 1.33 \text{ g/cm}^3$) en ambas MDI utilizadas (Figura 30).

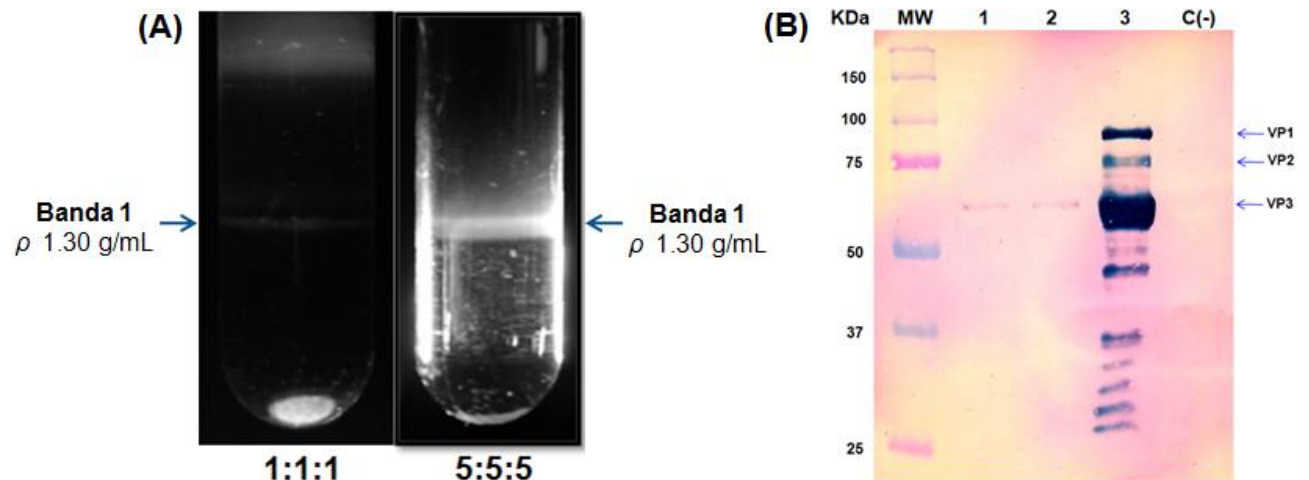


Figura 30. Purificación de PPVs de la coinfección con VP1, VP2 y VP3 a distintas MDI. (A) Gradientes de CsCl. (B) Western blot con el anticuerpo B1. 1, pellet MDI 1:1:1; 2, pellet MDI 5:5:5; 3, Banda 1 gradiente CsCl de MDI 5:5:5; C(-), control negativo, pellet de infección con Bac-Rep.

Posteriormente se procedió a verificar la presencia de partículas ensambladas en las muestras obtenidas a partir de los gradientes de CsCl, para lo cual se evaluó por microscopía electrónica de transmisión, donde se observaron cápsides de 25 nm de diámetro (Figura 31).

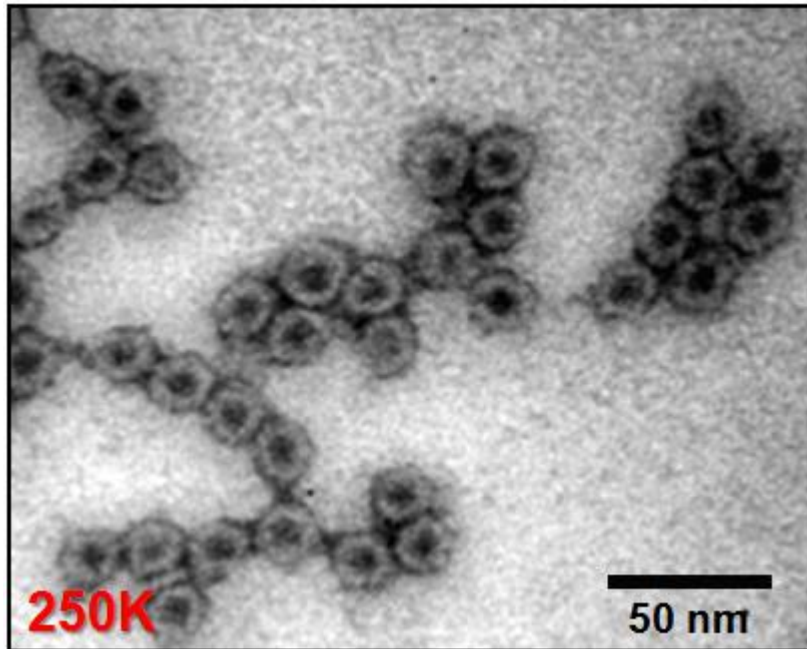


Figura 31. Microscopía electrónica usando tinción negativa con acetato de uranilo, de la banda 1 de la coinfección con VP1, VP2 y VP3 a una MDI de 5:5:5.

Después de confirmado el ensamblaje de PPVs al coexpresar las tres proteínas VPs sin fusionar, se procedió a evaluar si al incluir una de las fusiones se continuaban ensamblando las PPVs. Inicialmente se utilizó la fusión de EGFP-VP1 con VP2 y VP3 sin fusionar a diferentes MDI. Cuando se infectó con 0.1 ufp/célula de cada baculovirus, pensando que en la infección secundaria habría un mayor número de células infectadas con los tres baculovirus, no se observó la formación de bandas en los gradientes de CsCl. Posteriormente siguiendo la distribución probabilística de Poisson, donde se predice que para infectar una célula con más de un baculovirus recombinante simultáneamente es necesario utilizar una alta MDI, se utilizó una MDI de 5 ufp/célula de cada uno de los baculovirus. A las 72h de cultivo se cosecharon y se lisaron las células, para posteriormente montar los gradientes de CsCl donde se formaron dos bandas, una blanca

con una densidad de 1.28 g/mL y una de color verde con una densidad de 1.30 g/mL (Figura 32A), que contenían partículas de 35.2 y 30.2 nm de diámetro, respectivamente según mediciones de dispersión dinámica de la luz (Figura 32B). Por lo tanto, es posible encontrar PPVs correctamente ensambladas en ambas muestras.

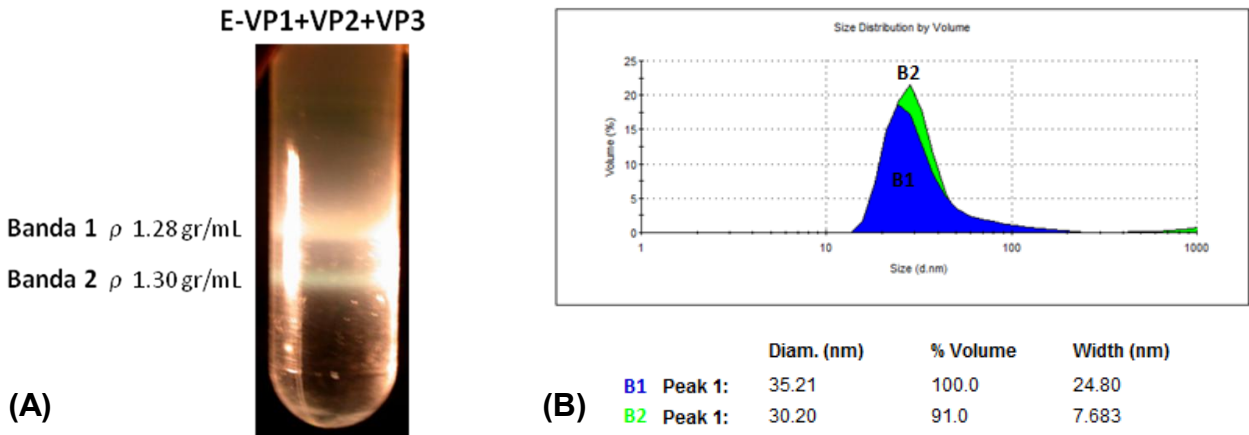


Figura 32. Gradiente de CsCl de la coinfección EGFP-VP1, VP2 y VP3 MDI 5.0 ufp/célula (A). Análisis por dispersión dinámica de la luz, banda 1 (B1) y banda B2 (B2) del gradiente (B).

Para verificar la presencia de PPVs se evaluaron las muestras mediante microscopía electrónica con tinción negativa con acetato de uranilo. En ambas muestras se observaron partículas ensambladas, pero en la banda dos (B2) se obtuvo un mayor número de partículas (Figura 33). Para verificar si las PPVs estaban fluoresciendo se tomaron 150 μ L de la muestra y se evaluaron en el espectrofluorímetro LS55 (Perkin Elmer Instruments), donde al ser excitadas a 488 nm y haciendo un escaneo de emisión se observó un pico de fluorescencia en la muestra de la banda 2 (verde) a los 510 nm que corresponde al pico de emisión de EGFP (Figura 34A).

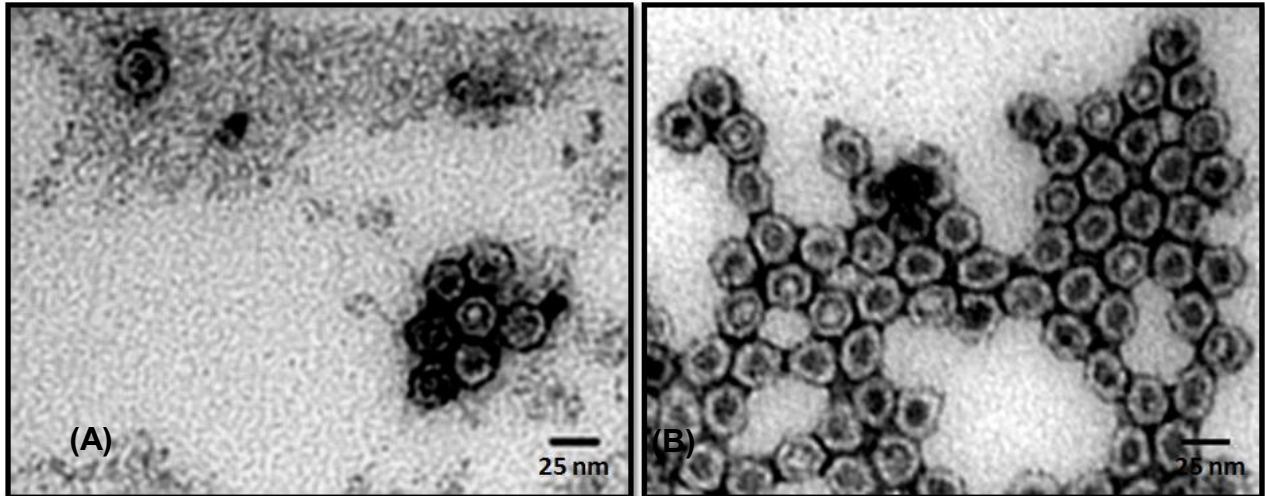


Figura 33. Microscopía electrónica de las PPVs de VAA purificadas por gradiente de CsCl (Coinfección EGFP-VP1, VP2 y VP3). Banda 1 (A), Banda 2 (B).

Para conocer la estequiometría de las proteínas VPs en las PPVs ensambladas se cargó 1 µg de proteína de la muestra de los gradientes en geles de poliacrilamida y se realizó tinción con nitrato de plata (Figura 34B). Mediante el análisis densitométrico se determinó que la estequiometria de las PPVs fluorescentes era igual que la propuesta para el virus silvestre de 1:1:10 (EGFP-VP1:VP2:VP3), teniendo en cuenta para el análisis la doble banda que se produce para VP2.

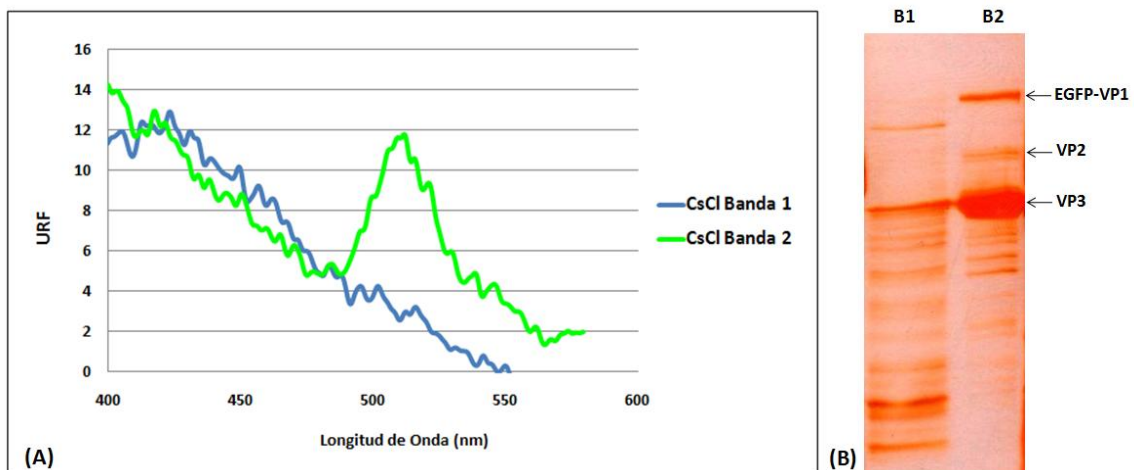


Figura 34. Espectro de emisión de fluorescencia de las PPVs de la coinfección de EGFP-VP1, VP2 y VP (A). SDS-PAGE gel teñido con nitrato de plata (B). URF, unidades relativas de fluorescencia.

En los gradientes de CsCl de la coinfección con EGFP-VP1 se observó que la producción de PPVs sin fusión (banda 1) fue mayor que las PPVs fluorescentes ensambladas con la fusión (banda 2), de acuerdo con las concentraciones de proteína total en cada una de las bandas, determinada por el método de Bradford. Para tratar de incrementar la eficiencia de ensamblaje con la fusión nos dimos a la tarea de evaluar si al coinfectar con una MDI más alta para el baculovirus que codifica por la fusión de EGFP-VP1 se incrementaba la eficiencia de ensamblaje de las PPVs con la fusión. Para ello se realizó una coinfección en donde se utilizó una MDI de 5:1:1 y 5:5:5 ufp/célula de los baculovirus de EGFP-VP1, VP2 y VP3, respectivamente. Al coinfectar con una MDI de 5:5:5 ufp/célula se obtuvo un mayor ensamblaje de las PPVs que cuando se coinfectó con una MDI de 5:1:1 ufp/célula, como se evidenció en los gradientes de CsCl y la cuantificación de la proteína total de las bandas recuperadas por el método de Bradford (Figura 35). A diferencia de los gradientes anteriores en este experimento la banda verde (B1) tuvo una densidad menor que la de la banda blanca (B2), posiblemente debido a la formación de agregados en esta última.

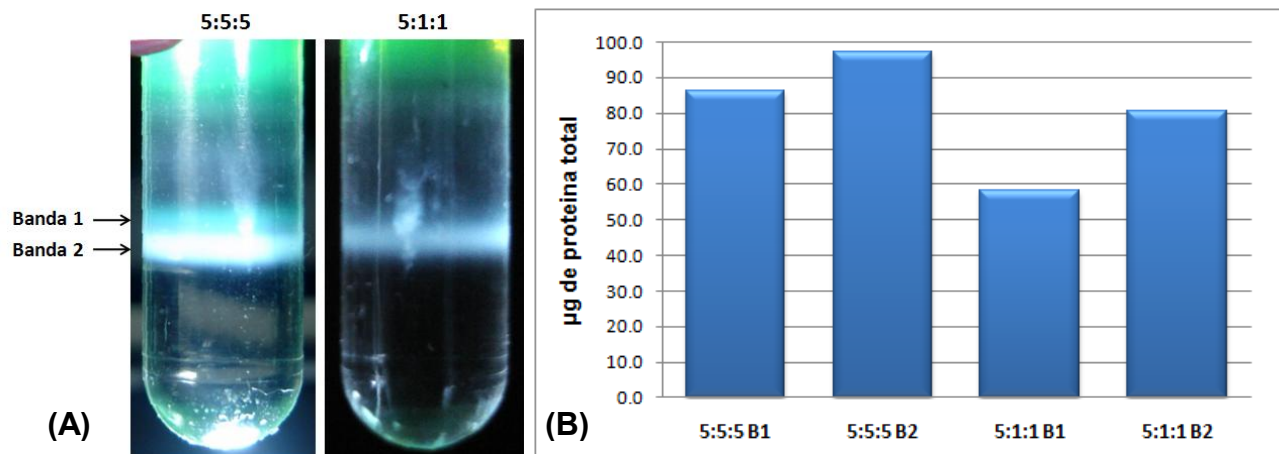


Figura 35. Gradientes de CsCl de las coinfecciones a MDI de 5:5:5 y 5:1:1 ufp/célula (A). Cuantificación de proteína total de cada una de las bandas recuperadas por el método de Bradford (B). B1, banda 1; B2, banda 2.

Las bandas obtenidas en estos gradientes fueron evaluadas por dispersión dinámica de la luz donde se confirmó la presencia de PPVs entre 25 y 28 nm de diámetro en las muestras correspondientes a las bandas 1 en ambos gradientes, mientras que en las bandas 2 se obtuvieron agregados de más de 500 nm, siendo posiblemente esta la causa de que la banda blanca haya tenido una mayor densidad. Mediante espectrofluorimetría se confirmó que las bandas de color verde (B1) de ambas coinfecciones estaban fluoresciendo a 510 nm al ser excitadas a 488 nm (Figura 36B). Al hacer el análisis de la composición de las partículas obtenidas mediante geles de poliacrilamida teñidos con plata, se observó una estequiometría de 1:1:10 de las proteínas EGFP-VP1:VP2:VP3 en la banda 1 (verde) de cada coinfección (Figura 36A).

Para confirmar que realmente teníamos PPVs ensambladas y fluoresciendo se evaluó la muestra de la banda 1 de la coinfección de 5:5:5 ufp/célula, donde se observaron un gran número de PPVs de 20 nm de diámetro (Figura 37). La diferencia en el tamaño de las PPVs en las mediciones por dispersión dinámica de la luz y microscopía electrónica es debida probablemente al grado de hidratación de la muestra.

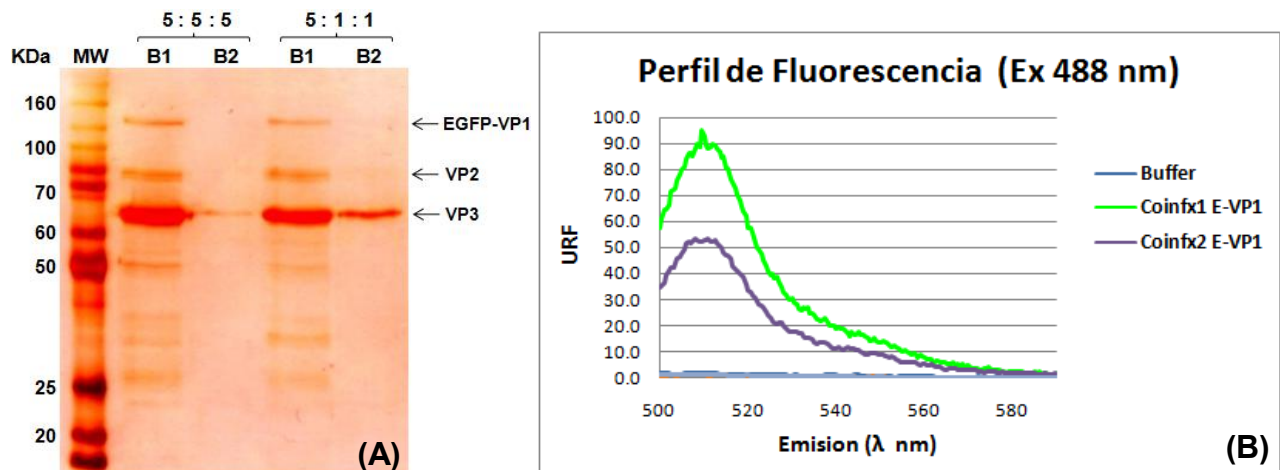


Figura 36. SDS-PAGE teñido con nitrato de plata, bandas de los gradientes de la coinfección con EGFP-VP1 (A). Perfil de fluorescencia de las bandas 1 (verdes) de los gradientes (B).

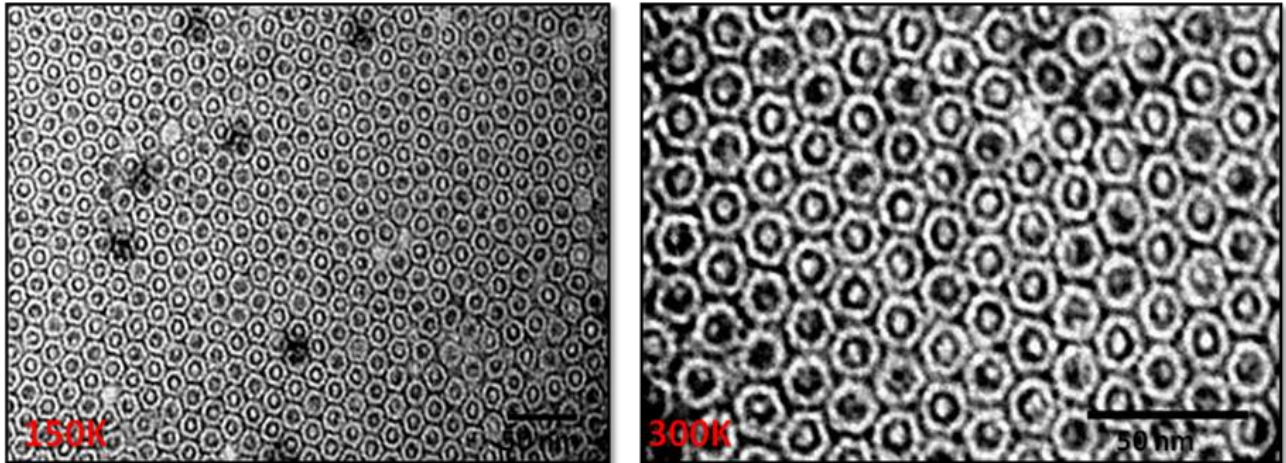


Figura 37. Microscopía electrónica de las PPVs del VAA-2 producidas mediante la coinfección con EGFP-VP1, VP2 y VP3 a una MDI de 5:5:5 ufp/célula.

Después de haber logrado el ensamblaje de PPVs con la fusión de EGFP-VP1 se continuó con la producción de las PPVs con las fusiones de EGFP-VP2 y EGFP-VP3. Para esto se realizaron infecciones simultáneas con el baculovirus que codifica para una de las fusiones y los otros dos baculovirus que codifican por las proteínas sin fusionar a una MDI de 5 ufp/célula. En estas coinfecciones no se obtuvo el ensamblaje de las PPVs con ninguna de las dos fusiones, por lo cual se decidió evaluar diferentes combinaciones de los baculovirus que codifican para las proteínas sin fusionar, Bac-VP1 y Bac-VP2 con la fusión de EGFP-VP3 (Tabla 3), considerando que VP3 es la proteína que se encuentra en mayor proporción en las PPVs, por lo que la fusión con EGFP puede producir un impedimento estérico para el ensamblaje de las cápsides. Sólo cuando se coinfectó con la combinación de Bac-VP2, Bac-VP3 y Bac-EGFP-VP3 se obtuvo el ensamblaje de PPVs de 29.6 nm de diámetro cuando se evaluaron mediante dispersión dinámica de la luz y de 25 nm en la microscopía electrónica (Figura 38). Sin embargo al evaluar las PPVs obtenidas en el espectrofluorímetro no se observó ninguna señal de emisión de fluorescencia a 510 nm, lo que nos sugiere que VP3 es necesaria para el ensamblaje de las cápsides y que las PPVs obtenidas no contenían la fusión de EGFP-VP3.

Tabla 4. Combinaciones de los baculovirus recombinantes usadas para el ensamblaje de las PPVs con la fusión de EGFP-VP3.

Coinfección	MDI (ufp/célula)	PPVs
VP1+VP2+E-VP3	5:5:5	NO
VP1+VP3+E-VP3	5:5:5	NO
VP2+VP3+E-VP3	5:5:5	SI

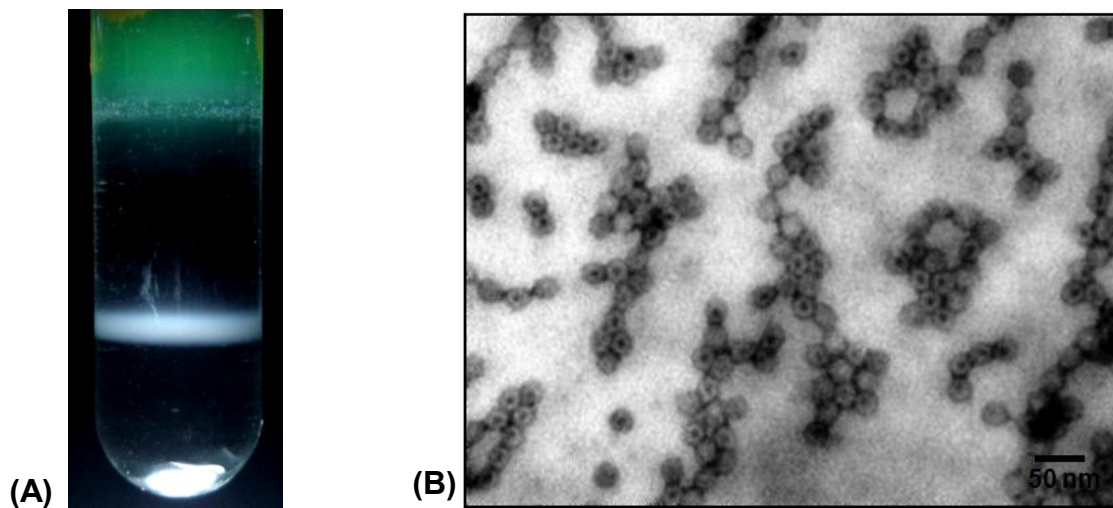


Figura 38. Gradiente de CsCl de la coinfección con VP2, VP3 y EGFP-VP3 a una MDI de 5 ufp/célula (A). Microscopía electrónica a 100K de la banda recuperada del gradiente de CsCl (B).

Otro parámetro que puede ser modulado como estrategia para la producción de PPVs es el tiempo de infección, donde infectar con varios baculovirus a diferentes tiempos puede resultar en variaciones estequiométricas entre las proteínas recombinantes producidas (Palomares et al. 2002). Con el propósito de lograr el ensamblaje de PPVs con las fusiones EGFP-VP2 y EGFP-VP3 se realizaron infecciones escalonadas, donde se infectó primero con el baculovirus de la fusión a una MDI de 5 ufp/célula y a las 3h se infectó con los otros dos baculovirus complementarios a la misma MDI. Se incubó a 27°C hasta que la viabilidad celular descendió al 50%, tiempo en el cual se cosecharon las células. Con esta nueva estrategia de infección la viabilidad celular disminuyó por debajo del 50% a las

56h. Las células fueron cosechadas, lisadas y con el extracto de pellet se hicieron gradientes de CsCl (0.39 g/mL), donde se formaron dos bandas en las muestras de cada coinfección. En el análisis por dispersión dinámica de la luz se evidenciaron partículas de 23-34 nm de diámetro para la coinfección con EGFP-VP2 y de 21-29 nm para la coinfección con EGFP-VP3 (Figura 39C). También se observó un bajo porcentaje de partículas de alrededor de 100 nm las que podrían corresponder a PPVs agregadas.

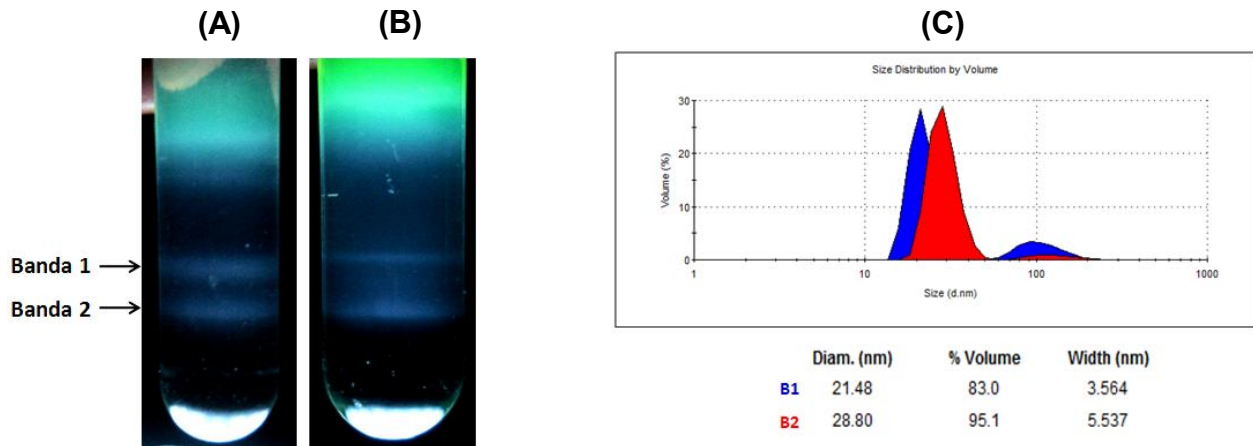


Figura 39. Gradientes de CsCl de las coinfecciones con EGFP-VP2 (A) y con EGFP-VP3 (B). Análisis por dispersión dinámica de la luz de las bandas de la coinfección con EGFP-VP3 (C).

Mediante la evaluación por SDS-PAGE de las PPVs obtenidas en los gradientes y tinción con nitrato de plata, se determinó la estequiometría de las partículas virales. Para las PPVs con EGFP-VP2 fue de 5:2:5 (VP1:VP2:VP3) y para las PPVs con EGFP-VP3 fue de 2:1:6 (VP1:VP2:VP3). A pesar de que en la coinfección con EGFP-VP2 no se infectó con VP2, ni en la coinfección con EGFP-VP3 se infectó con VP3, en ambas coinfecciones se detectaron estas proteínas, lo cual puede ser debido a la proteólisis de las fusiones o de las otras proteínas VPs (Figura 40).

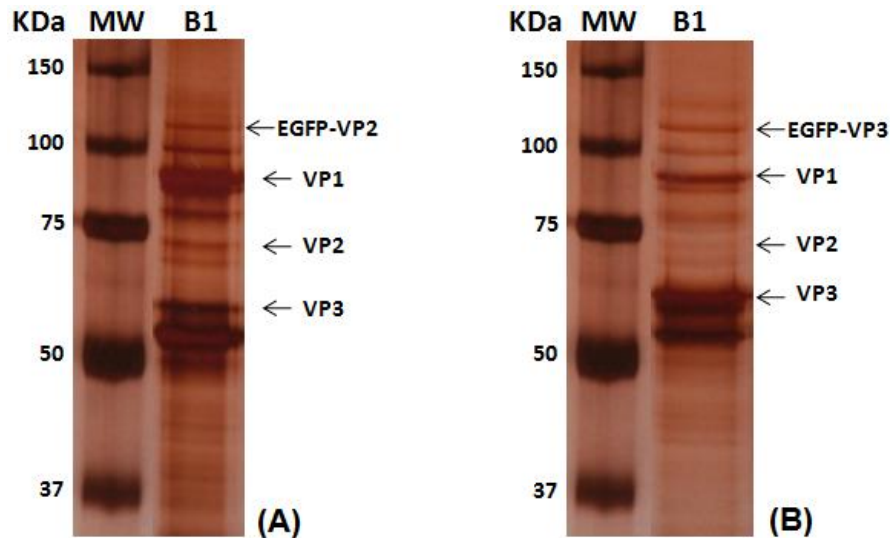


Figura 40. SDS-PAGE teñido con plata de las PPVs recuperadas de la banda 1 (B1) de los gradientes de CsCl. Coinfección con EGFP-VP2 (A) y con EGFP-VP3 (B).

Para evaluar si las partículas estaban fluoresciendo se midió la intensidad de fluorescencia de 150 μ L de la muestra en el espectrofluorímetro (excitación 488nm/emisión 510 nm). Todas las bandas fluorescieron pero la fluorescencia fue mayor en la banda 1 de ambas coinfecciones (Figura 41).

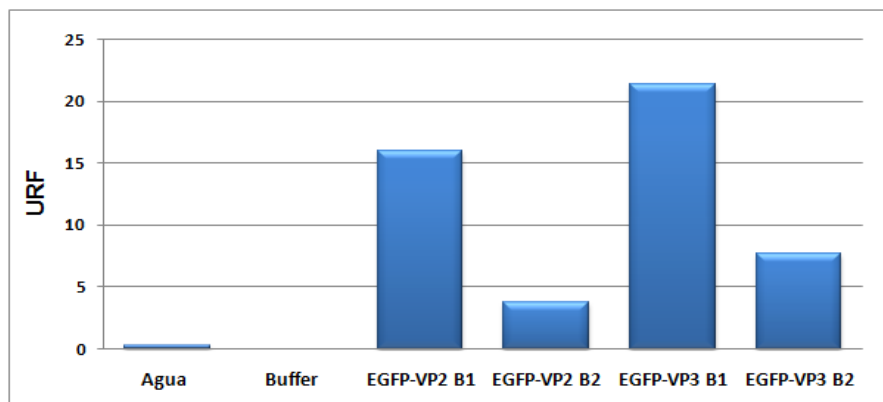


Figura 41. Perfil de fluorescencia de las bandas obtenidas de los gradientes de CsCl de las coinfecciones con EGFP-VP2 y EGFP-VP3.

Para verificar que realmente teníamos PPVs correctamente ensambladas, se realizó análisis por microscopía electrónica de cada una de las bandas recuperadas en los gradientes. En las muestras de la coinfección con EGFP-VP2 se observaron partículas ensambladas de 25 nm de diámetro en ambas bandas (Figura 42), sin embargo las

partículas de la banda 2 estaban agregadas, lo cual puede explicar porque la banda blanca migro más abajo que la banda verde en el gradiente de CsCl. Para la coinfección con EGFP-VP3 se evidenciaron PPVs de 23-25 nm de diámetro en ambas bandas del gradiente y al igual que en la coinfección con EGFP-VP2 en la banda 2 se observo un gran número de agregados (Figura 43).

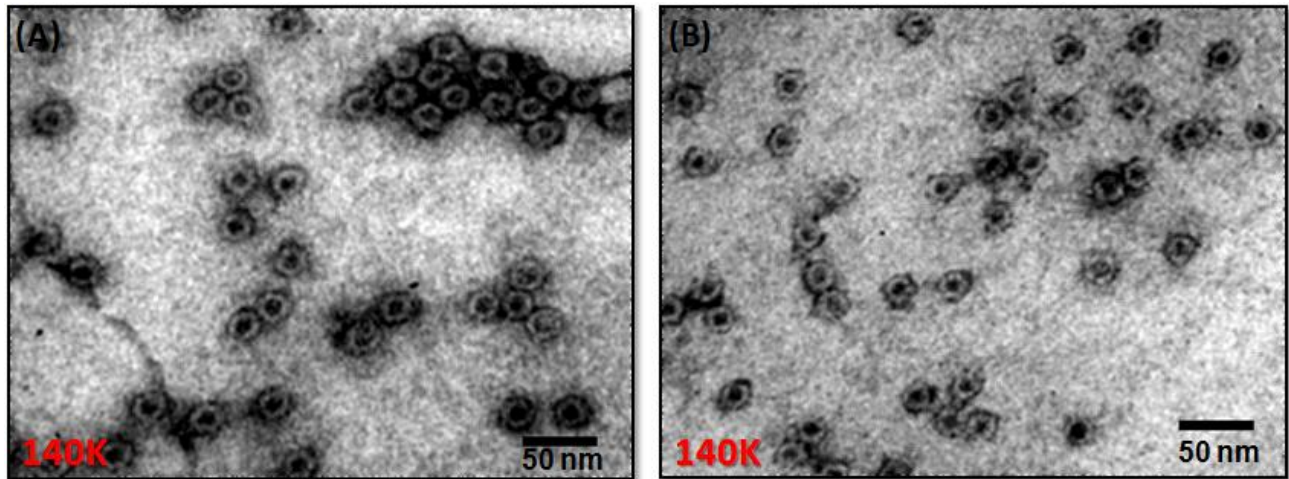


Figura 42. Microscopía electrónica de las PPVs producidas mediante la coinfección escalonada con EGFP-VP2, VP1 y VP3 a una MDI de 5:5:5 ufp/célula. (A) Banda 1 del gradiente de CsCl y (B) banda 2 del mismo gradiente.

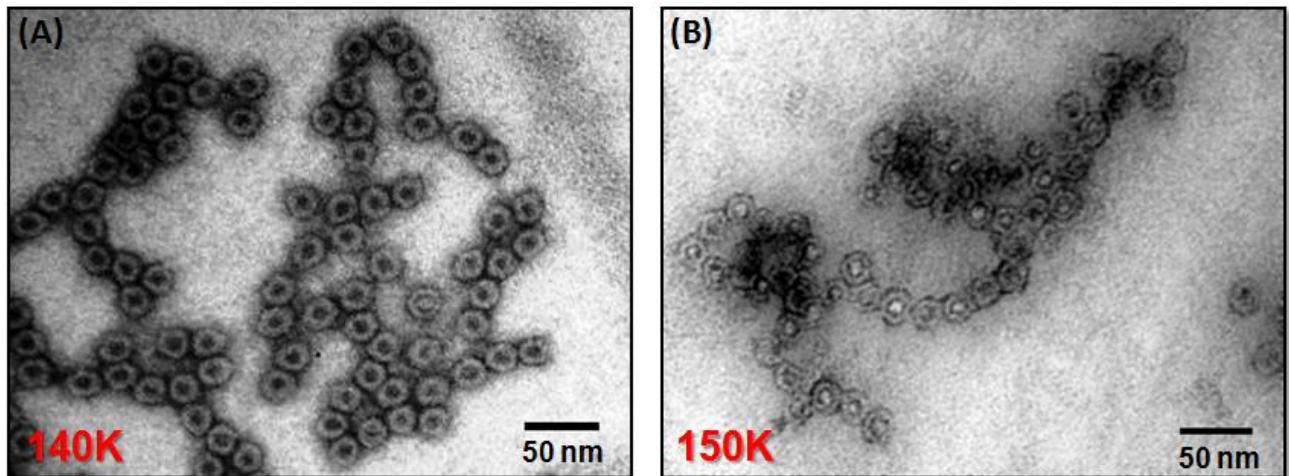


Figura 43. Microscopía electrónica de las PPVs producidas mediante la coinfección con VP1, VP2 y EGFP-VP3 a una MDI de 5:5:5 ufp/célula. Banda 1 del gradiente de CsCl (A) y banda 2 (B).

Análisis de las PPVs por citometría de flujo

Después de haber confirmado que las PPVs con EGFP-VP1 producidas y purificadas estaban fluoresciendo, se procedió a evaluar si por citometría de flujo era posible detectar y analizar la composición de las cápsides mediante el parámetro de intensidad media de fluorescencia. Como controles positivos de tamaño y fluorescencia se usaron fluoroesferas de 20, 40 y 100 nm de diámetro, que al ser excitadas a 488 nm con el laser de argón emiten en el espectro amarillo-verde a 510 nm (canal FL-1). Al evaluar las PPVs con la fusión de EGFP-VP1 en el citómetro no se detectó una población fluorescente definida en las muestras evaluadas en el canal FL1-H (verde), a diferencia de las fluoroesferas donde si se detectó una población que estaba fluoresciendo. Sin embargo, no es posible discriminar poblaciones por tamaños entre las diferentes fluoroesferas mediante el parámetro de *side scatter*, debido a su diámetro tan pequeño, siendo este mucho menor a la longitud de onda del laser de excitación (488 nm) (Figura 44).

Posiblemente la intensidad de fluorescencia de las PPVs es muy baja comparada con la de las fluoroesferas, que tienen entre 1.8×10^2 y 7.4×10^3 moléculas de fluoresceína por cada nanoesfera. En el análisis de las PPVs mediante electroforesis en geles de poliacrilamida, tinción con nitrato de plata y análisis densitométrico, se observó una estequiometria de 1:1:10 (VP1:VP2:VP3) lo cual indica que hay 5 EGFP-VP1 por cada cápside (Figura 36), cantidad por lo menos 36 veces menor que la presente en las nanoesferas. Esto explica que no se haya podido registrar su fluorescencia en el citómetro. Estos resultados concuerdan con el trabajo de Brussaard *et al.* (2004), donde utilizaron virus de diferentes tamaños y tiñeron el material genético con un agente intercalante fluorescente, pero no fue posible detectar los virus más pequeños (30 y 60 nm).

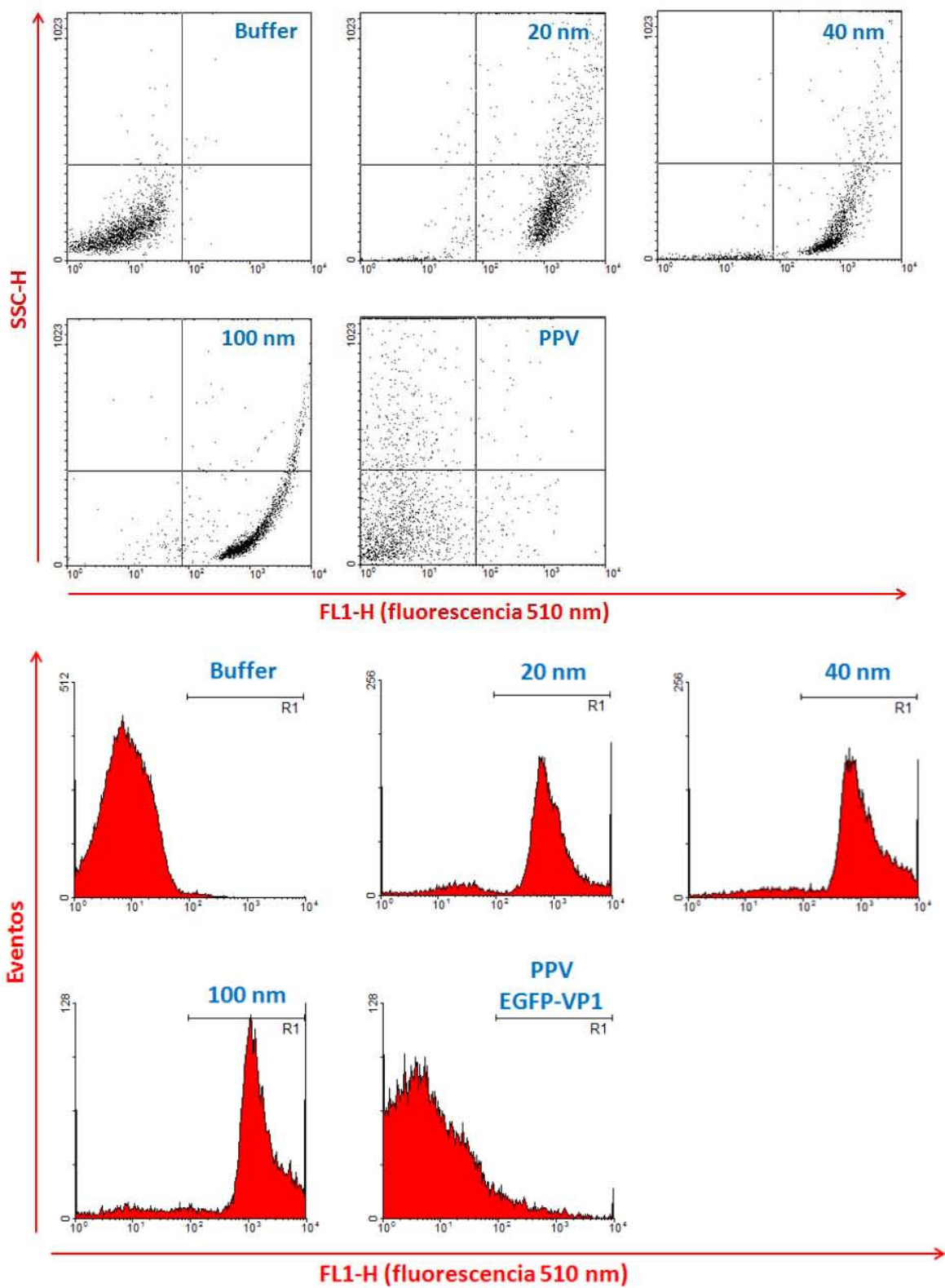


Figura 44. Análisis por citometría de flujo de las PPVs con EGFP-VP1 y fluoeresferas de 20, 40 y 100 nm.

Cuantificación de PPVs por ELISA

Para saber cuántas cápsides había en cada una en las muestras recuperadas de los gradientes de CsCl, se cuantificaron las PPVs mediante un ensayo de ELISA utilizando el kit comercial de PROGEN Biotechnik, donde se utiliza el anticuerpo A20 que reconoce únicamente epítopes conformacionales en las cápsides ensambladas (Figura 45). Para este ensayo se generó una curva estándar con diluciones seriales de cápsides de VAA-2 puras incluidas en el kit (ver materiales y métodos).

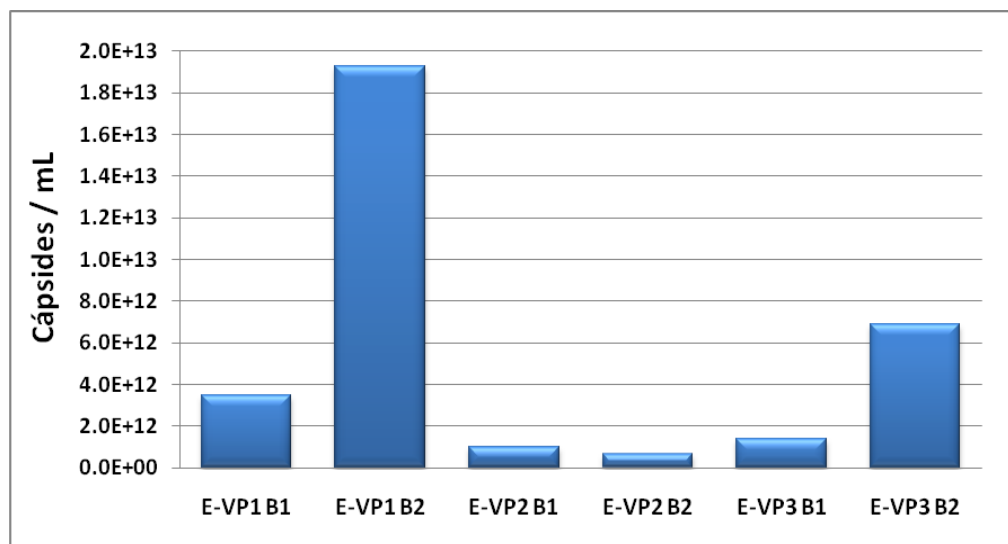


Figura 45. Cuantificación de cápsides de las muestras recuperadas de los gradientes de CsCl. E-VP1, PPVs de la coinfección con EGFP-VP1; E-VP2, PPVs de la coinfección con EGFP-VP2; E-VP3, PPVs de la coinfección con EGFP-VP3; B1, banda 1; B2, banda 2.

En la coinfección con Bac-EGFP-VP1 fue donde se obtuvieron los mejores rendimientos de PPVs con EGFP (1.9×10^{13} cápsides/mL, EGFP-VP1 B2), seguido por la coinfección con Bac-EGFP-VP3 (1.49×10^{12} cápsides/mL, EGFP-VP3 B1), siendo este último un orden de magnitud menor que el obtenido para EGFP-VP1 (Figura 45). En la coinfección con Bac-EGFP-VP2 se obtuvo el rendimiento más bajo (1.9×10^{11} cápsides/mL, EGFP-VP2 B1) de PPVs marcadas con EGFP, siendo este 20 veces menor que el obtenido para la coinfección con EGFP-VP1.

La disponibilidad de las proteínas fusionadas (EGFP-VPs) en el núcleo de las células, puede ser un factor limitante para el ensamblaje de las PPVs marcadas con EGFP, por lo cual nos dimos a la tarea de evaluar las células Sf9 coinfectadas con los Bac-EGFP-VPs y los Bac-VPs por microscopía de epifluorescencia a las 48h de cultivo.

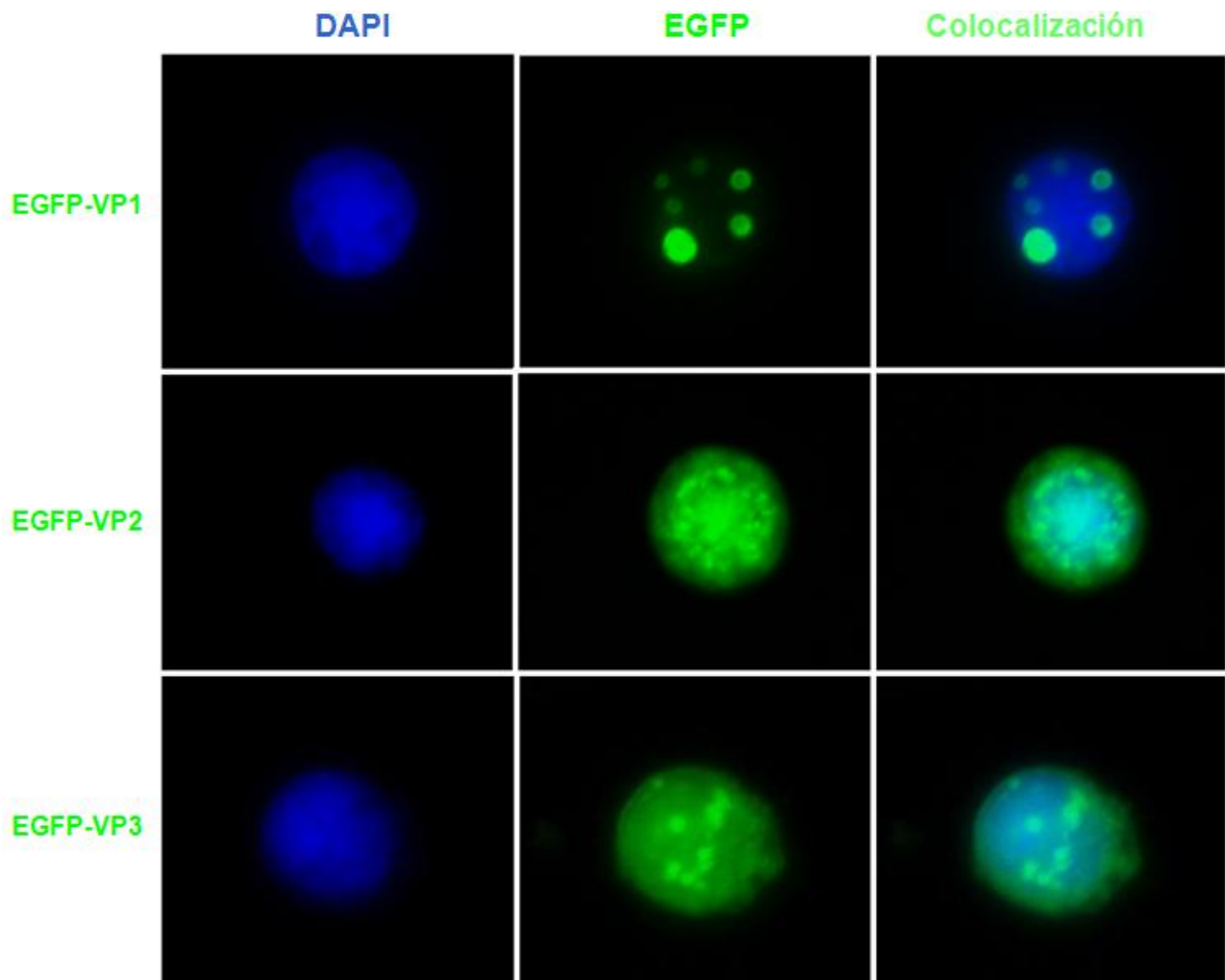


Figura 46. Células Sf9 coinfectadas con los baculovirus recombinantes de las fusiones EGFP-VPs y de las proteínas VP sin fusionar a las 48h de cultivo.

Se observó que en las células Sf9 coinfectadas con Bac-EGFP-VP1, Bac-VP2 y Bac-VP3, la fluorescencia de EGFP-VP1 a las 48h de cultivo se localizó completamente en el núcleo de las células, en focos claramente definidos que posiblemente corresponde a los nucléolos, lugar donde se ha propuesto se da el ensamblaje de las cápsides (Figura 46).

Mientras que para las coinfecciones con EGFP-VP2 y EGFP-VP3, la fluorescencia de las fusiones a las 48h se observó tanto en el citoplasma de las células como en el núcleo, siendo el proceso de translocación del citoplasma al núcleo menos eficiente que para la fusión de EGFP-VP1. Posiblemente esta es una de las razones por lo cual la eficiencia de ensamblaje de las PPVs con EGFP-VP1 es mayor que la eficiencia de ensamblaje de PPVs con EGFP-VP2 y EGFP-VP3.

Evaluación de la capacidad de unión e internalización de las PPVs por microscopía de epifluorescencia y confocal

Después de haber confirmado por microscopía electrónica la presencia de las cápsides y cuantificar el número de PPVs en cada una de las muestras de las fusiones, procedimos a evaluar su capacidad de unión e internalización en las células de mamífero (HEK293T). Para esto se sembraron 1×10^4 células/pozo en *chamber slides* de 8 pozos, se pusieron en contacto con 5×10^5 cápsides/célula y se incubó por 4h y 24h a 37°C, 5% CO₂. Después de cada tiempo de incubación las células se lavaron, se fijaron y se permeabilizaron para la posterior inmunodetección de las cápsides con el anticuerpos primario A20 que detecta epítopes conformacionales en cápsides ensambladas y el secundario anti-ratón Alexa Fluor 568, para corroborar que efectivamente la fluorescencia detectada en verde provenía de las cápsides de VAA-2 marcadas con EGFP (Figura 47). Se observó que las distintas cápsides con las fusiones de EGFP-VP1, EGFP-VP2 y EGFP-VP3 a las 4h se encontraban principalmente en el citoplasma de las células y una baja proporción estaban unidas a la membrana plasmática, mientras que a las 24h de incubación, además de estar en el citoplasma de la célula, fluoresciendo y colocalizando con el anticuerpo A20, también se observó una baja proporción de PPVs en el núcleo de las células. Estos hallazgos nos sugieren que las cápsides producidas tienen la capacidad de unirse y entrar a las células de mamífero HEK293T.

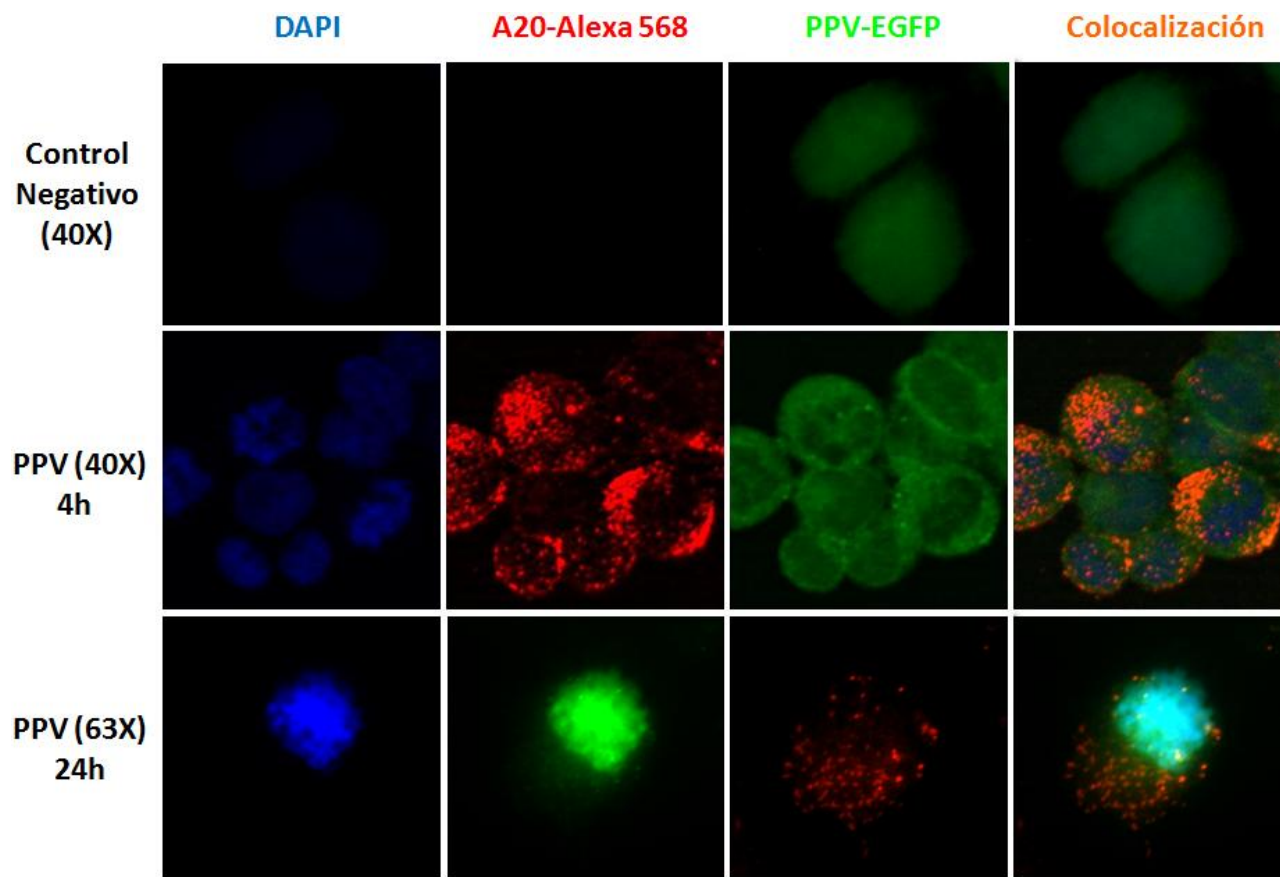


Figura 47. Microscopía de epifluorescencia Células HEK293T incubadas con cápsides de VAA-2 fusionadas con EGFP-VP1.

También se evaluaron dos concentraciones de PPVs con la fusión de EGFP-VP1 (5×10^4 y 5×10^5 cápsides/célula) donde se observó que el proceso de unión e internalización fue dosis dependiente, ya que donde se utilizó un mayor número de PPVs/célula hubo un mayor número de cápsides unidas e internalizadas (Figura 48). En experimentos posteriores se realizaron los ensayos de internalización por microscopía de epifluorescencia de las PPVs con EGFP-VP2 y EGFP-VP3, donde se observó que al igual que con las PPVs con EGFP-VP1 tuvieron la capacidad de unirse e internalizarse en las células de mamífero HEK293T, encontrándose a las 24h en su mayoría el citoplasma de la célula (Figura 49).

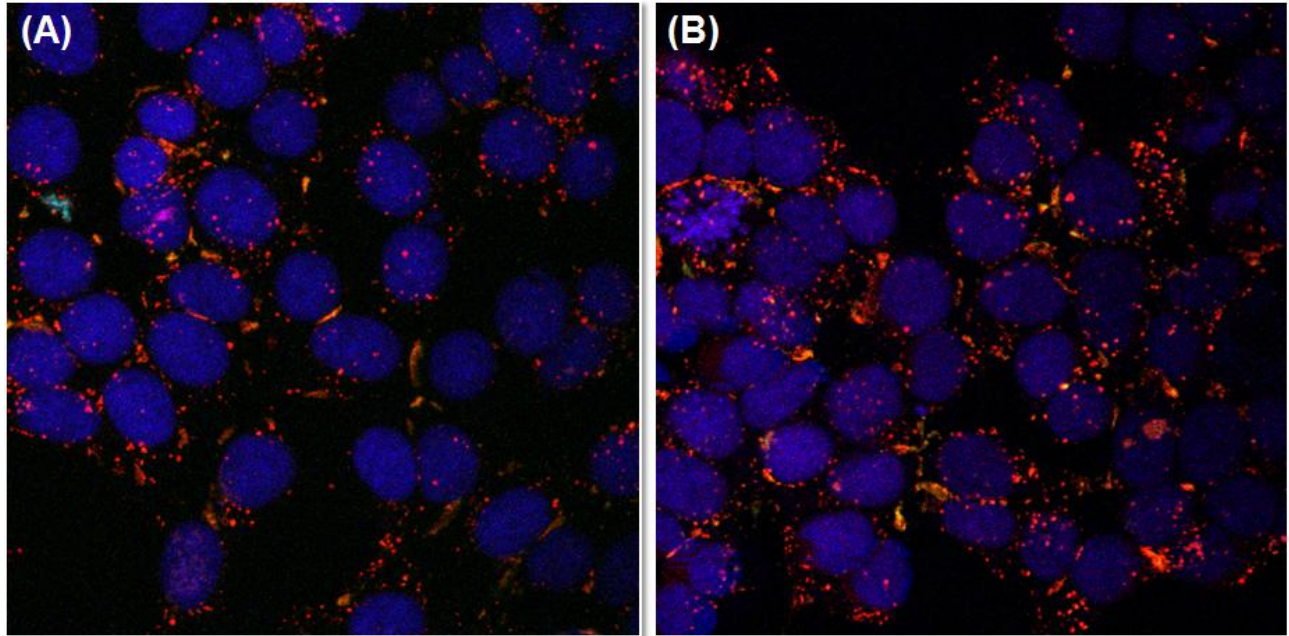


Figura 48. Microscopía confocal (63X) de células HEK293T infectadas con 5×10^4 PPVs/célula (A) y 5×10^5 PPVs/célula (B), Cápsides con la fusión EGFP-VP1.

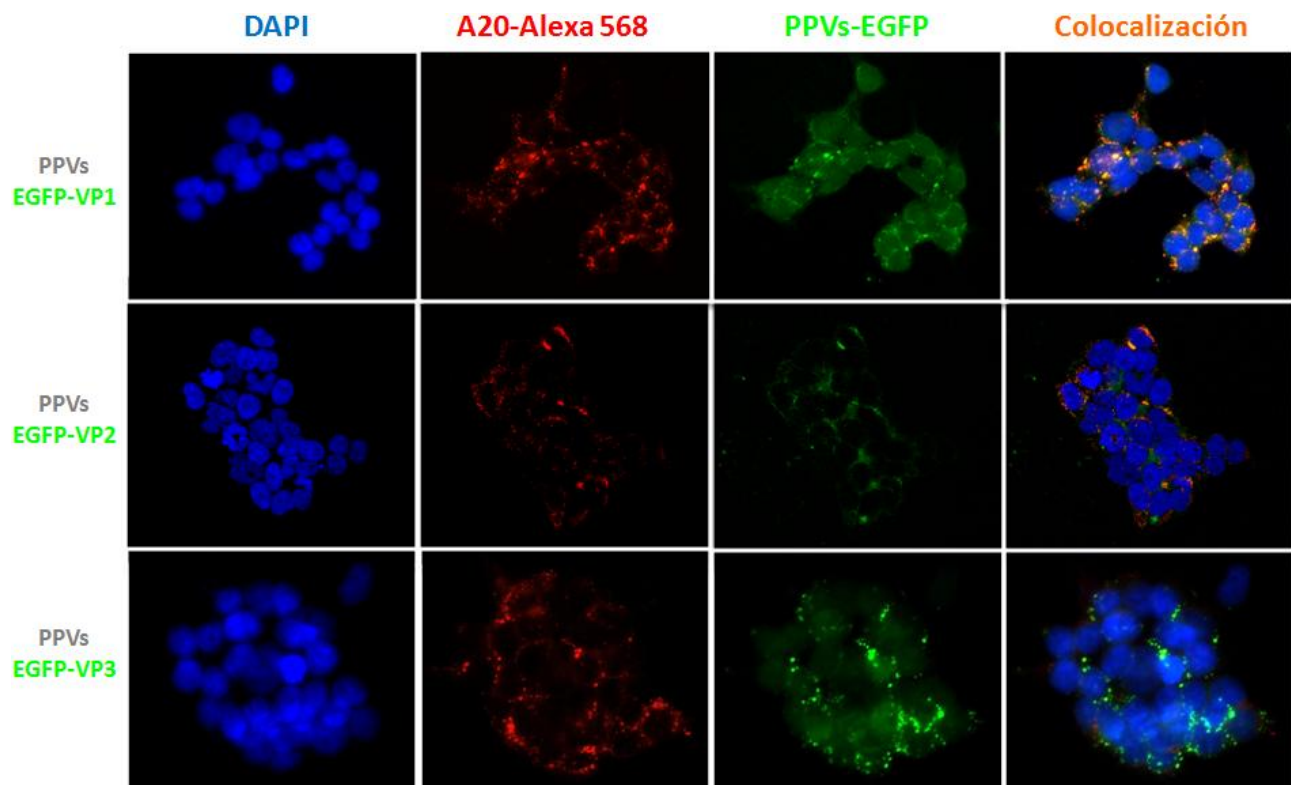


Figura 49. Microscopía de epifluorescencia (40X) de células HEK293T incubadas con cápsides de VAA-2 fusionadas con EGFP-VP1, EGFP-VP2 y EGFP-VP3.

Evaluación de la capacidad de unión e internalización de las PPVs por citometría de flujo

Para evaluar si existe alguna diferencia entre las cápsides producidas con las diferentes fusiones y diferente composición en cuanto a su capacidad de interactuar con las células HEK293T, ya sea uniéndose a su receptor en la membrana plasmática o su capacidad de internalización, se incubaron 1.5×10^6 células en placas de 6 pozos con 1×10^5 cápsides/célula durante 24h. Después de este periodo de incubación, se realizó el protocolo de tinción con el anticuerpo A20, fijando las células con paraformaldehído al 2% y permeabilizándolas con saponina al 0.3%. Los resultados se muestran en la Figura 50.

Como control positivo para el ensayo se utilizaron células HEK293T incubadas con las PPVs con EGFP-VP1, donde después de 24h de incubación las células solamente se lavaron y fijaron con paraformaldehído. En esta muestra se observó que un 34% de las células fueron positivas para EGFP (FL-1, Figura 50) y como control negativo se utilizaron células sin exponer a PPVs, donde el 99.25% de las células fueron negativas, lo cual valida nuestro ensayo y nos indica que esta metodología nos permite discriminar entre células infectadas con PPVs y células sin PPVs. Cuando se evaluaron las muestras de las células expuestas a las cápsides con diferente composición, se observó que después del tratamiento de fijación, permeabilización, incubación con los anticuerpos y los diferentes lavados, se perdió la fluorescencia de EGFP en las PPVs. Sin embargo cuando se evaluó en el canal FL-2 la fluorescencia del conjugado A20-anti-ratón marcado con ficoeritrina el cual se une a las PPV ensambladas, se observó que para las células expuestas a las PPVs con EGFP-VP1 hubo un 67.6% de células positivas, para EGFP-VP2 un 51.8% y para EGFP-VP3 un 78.7% (Figura 50). Según los resultados anteriores las PPVs con EGFP-VP3 son las que tienen la mejor capacidad de unirse y ser internalizadas por las células y las PPVs con EGFP-VP2, las que tienen la menor capacidad. Sin embargo es necesario corroborar esta afirmación mediante el uso de células expuestas a las PPVs pero en fresco, sin ser sometidas al protocolo de tinción.

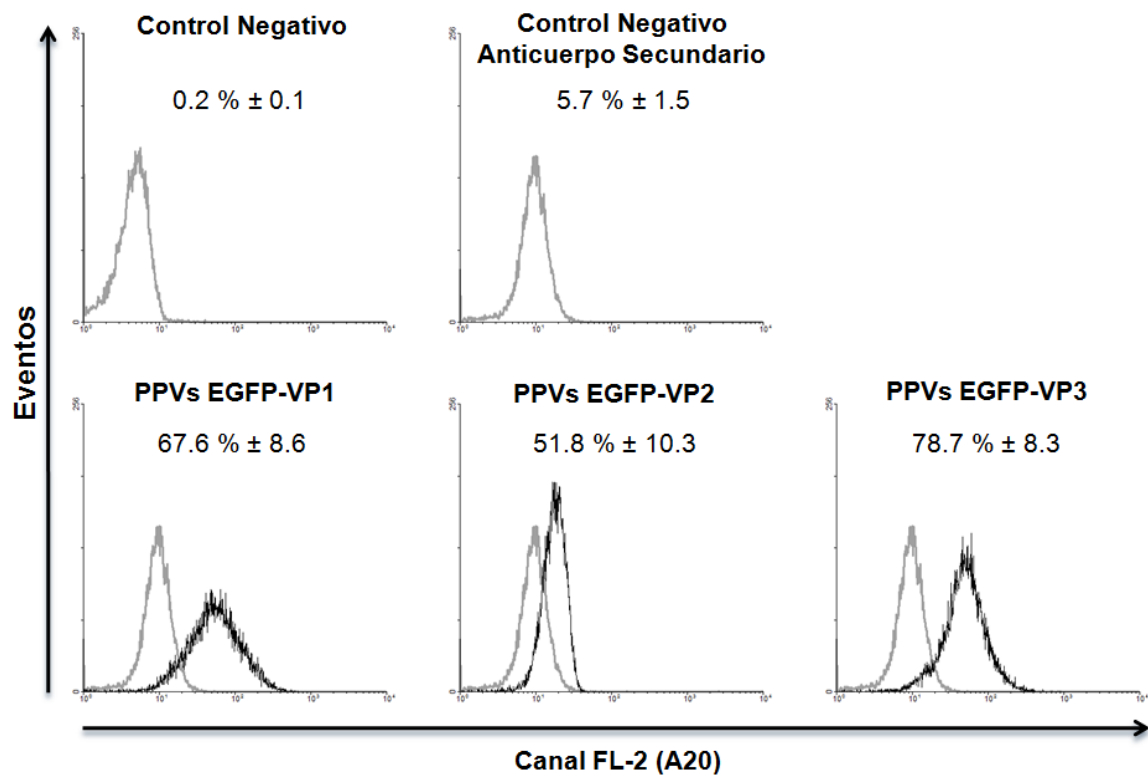
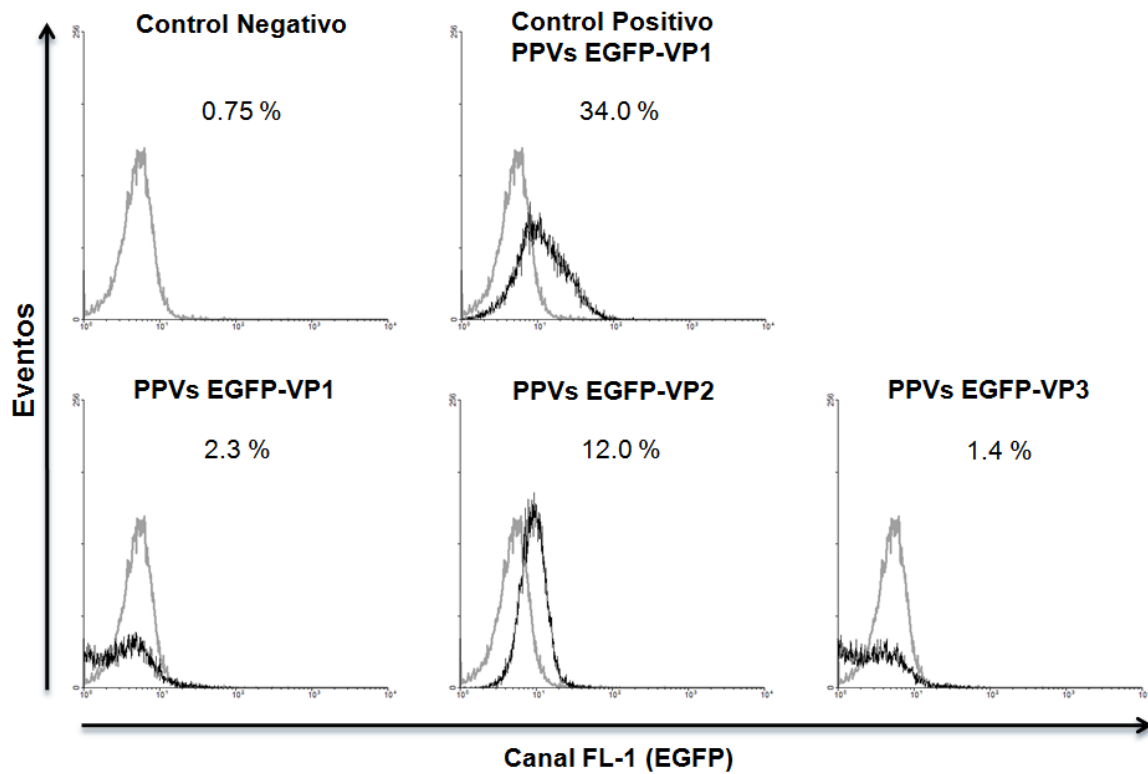


Figura 51. Evaluación de células HEK293T infectadas con PPVs con diferente composición por citometría de flujo.

CONCLUSIONES

En este trabajo se construyeron los baculovirus recombinantes que codifican por las proteínas VP1, VP2 y VP3 del VAA-2 de manera independiente. Estos baculovirus sirvieron para expresar las proteínas VP de manera independiente y para ensamblar cápsides *in vivo* con diferentes estequiometrías de las proteínas VP, por medio de la variación en la MDI de cada baculovirus.

Las tres proteínas VP del VAA-2 fueron fusionadas con EGFP en su extremo amino terminal, lo cual nos permitió tener cápsides de VAA-2 con una de sus proteínas estructurales marcada para evaluar su capacidad de unión e internalización en células de mamífero por microscopía confocal y citometría de flujo.

La cromatografía de intercambio aniónico nos sirvió como una herramienta para la eliminación de los baculovirus de los lisados celulares y algunas proteínas contaminantes, sin embargo fue necesario el uso de gradientes de CsCl debido a que este es el único método que hasta el momento nos permite discriminar entre cápsides con EGFP y sin ella, con base en diferencias de densidad.

En el análisis de las PPV por HPLC se detectó un aumento en la absorbancia en el tiempo de elusión calculado para las partículas de VAA ensambladas, sin embargo no se observó una población claramente definida debido a la presencia de otros contaminantes como proteína desensamblada y degradada.

Las coinfecciones con Bac-EGFP-VP1, Bac-VP2 y Bac-VP3 tuvieron los mayores rendimientos de ensamblaje de PPVs con EGFP. Posiblemente la fusión de EGFP en el extremo amino terminal de VP2 y VP3 disminuya la eficiencia de transporte de la proteína de fusión al núcleo, ya que es precisamente en el extremo amino terminal donde esta la señal de localización nuclear de VP2. Por otro lado se ha postulado que VP2 es la responsable de transportar a VP3 al núcleo, lugar donde ocurre el ensamblaje de las partículas virales.

Las PPVs producidas con diferente composición tuvieron la capacidad de unirse y ser internalizadas al citoplasma de las células de mamífero HEK293T. Incluso a las 24h se observaron algunas en el núcleo de la célula aunque en menor proporción que las encontradas en el citoplasma.

Las PPVs con la fusión de EGFP-VP3 con una estequiometría de 2:1:6 de las proteínas VP1:VP2:VP3 fueron las que mayor capacidad de unión e internalización a las células HEK293T tuvieron, y las que contenían la fusión de EGFP-VP2 con una estequiometría de 5:2:5 de las proteínas VP1:VP2:VP3 se unieron e internalizaron en la menor proporción. Las PPVs con EGFP-VP1 en una estequiometría de 1:1:10 de las proteínas VP1:VP2:VP3, similar al virus nativo, se unieron y entraron en las células de manera eficiente, pero menor a las PPVs con EGFP-VP3. La menor eficiencia de las PPVs con EGFP-VP2 posiblemente se deba a que al tener una mayor proporción de VP1 que es la proteína más grande, se generen cambios estructurales en los dominios de unión al receptor durante el ensamblaje de la PPV, modificando el tropismo por esta línea celular.

En este trabajo se logró el ensamblaje de PPVs de VAA-2 con mayor eficiencia de entrada a la célula hospedera que la estequiometría reportada para en virus nativo, mediante la expresión independiente de cada una de sus proteínas estructurales. Utilizando la estrategia propuesta aquí, es posible llegar a la producción de vectores virales con mayor capacidad transductora.

PERSPECTIVAS

Será necesario evaluar cuales son los otros factores limitantes para el ensamblaje de las PPVs marcadas con EGFP, adicionales a la eficiencia de transporte al núcleo de las fusiones, con el fin de mejorar los rendimientos de producción y obtener el material suficiente para estudios posteriores.

Mejorar el sistema para producción de cápsides con mayor capacidad de unión e internalización a través del uso de un sólo baculovirus que codifique para las tres proteínas estructurales. Para lograr este fin se propone utilizar estrategias que modulen la transcripción y traducción de cada gen, con el fin de obtener partículas con la composición estequiométrica definida en este trabajo.

Generar partículas completas con genoma o el transgen que se desee administrar para evaluar si su capacidad de unión e internalización se mantiene y realizar estudios de transducción en las células HEK293T, así como en otras líneas celulares.

Estudiar los cambios estructurales en las PPVs con diferentes composiciones e identificar cuáles son cambios en las PPVs con EGFP-VP3 que le confieren una mayor capacidad de unión e internalización en las células de mamífero HEK293T.

BIBLIOGRAFIA

- Acland, G. M., Aguirre, G. D., Ray, J., Zhang, Q., Aleman, T. S., Cideciyan, A. V., Pearce-Kelling, S. E., Anand, V., Zeng, Y., Maguire, A. M., Jacobson, S. G., Hauswirth, W. W. and Bennett, J. (2001). "Gene therapy restores vision in a canine model of childhood blindness." Nat Genet **28**(1): 92-5.
- Alexander, I. E., Cunningham, S. C., Logan, G. J. and Christodoulou, J. (2008). "Potential of AAV vectors in the treatment of metabolic disease." Gene Ther **15**(11): 831-9.
- Aucoin, M. G., Perrier, M. and Kamen, A. A. (2006). "Production of adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: optimization of baculovirus concentration ratios." Biotechnol Bioeng **95**(6): 1081-92.
- Aucoin, M. G., Perrier, M. and Kamen, A. A. (2008). "Critical assessment of current adeno-associated viral vector production and quantification methods." Biotechnol Adv **26**(1): 73-88.
- Becerra, S. P., Koczot, F., Fabisch, P. and Rose, J. A. (1988). "Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mRNA splicing and alternative initiations from a single transcript." J Virol **62**(8): 2745-54.
- Berns, K. I. (1990). "Parvovirus replication." Microbiol Rev **54**(3): 316-29.
- Brussaard, C. P. (2004). "Optimization of procedures for counting viruses by flow cytometry." Appl Environ Microbiol **70**(3): 1506-13.
- Brussaard, C. P., Marie, D. and Bratbak, G. (2000). "Flow cytometric detection of viruses." J Virol Methods **85**(1-2): 175-82.
- Buller, R. M. and Rose, J. A. (1978). "Characterization of adenovirus-associated virus-induced polypeptides in KB cells." J Virol **25**(1): 331-8.
- Buning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadts-Humme, S. and Hallek, M. (2008). "Recent developments in adeno-associated virus vector technology." J Gene Med.
- Chiorini, J. A., Yang, L., Safer, B. and Kotin, R. M. (1995). "Determination of adeno-associated virus Rep68 and Rep78 binding sites by random sequence oligonucleotide selection." J Virol **69**(11): 7334-8.
- Duan, D., Li, Q., Kao, A. W., Yue, Y., Pessin, J. E. and Engelhardt, J. F. (1999). "Dynamin is required for recombinant adeno-associated virus type 2 infection." J Virol **73**(12): 10371-6.
- During, M. J., Samulski, R. J., Elsworth, J. D., Kaplitt, M. G., Leone, P., Xiao, X., Li, J., Freese, A., Taylor, J. R., Roth, R. H., Sladek, J. R., Jr., O'Malley, K. L. and Redmond, D.

E., Jr. (1998). "In vivo expression of therapeutic human genes for dopamine production in the caudates of MPTP-treated monkeys using an AAV vector." Gene Ther **5**(6): 820-7.

Fabian-Macedo, J. C. (2007). "Tesis de maestria: "Estudio de las variables de proceso durante la purificacion del antigeno de superficie de hepatitis B (AsHB)." Universidad Nacional Autonoma de Mexico, Cuernavaca, Mexico.

Flannery, J. G., Zolotukhin, S., Vaquero, M. I., LaVail, M. M., Muzyczka, N. and Hauswirth, W. W. (1997). "Efficient photoreceptor-targeted gene expression in vivo by recombinant adeno-associated virus." Proc Natl Acad Sci U S A **94**(13): 6916-21.

Girod, A., Wobus, C. E., Zadori, Z., Ried, M., Leike, K., Tijssen, P., Kleinschmidt, J. A. and Hallek, M. (2002). "The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity." J Gen Virol **83**(Pt 5): 973-8.

Goncalves, M. A. (2005). "Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector." Virol J **2**: 43.

Grieger, J. C., Snowdy, S. and Samulski, R. J. (2006). "Separate basic region motifs within the adeno-associated virus capsid proteins are essential for infectivity and assembly." J Virol **80**(11): 5199-210.

Grimm, D. and Kay, M. A. (2003). "From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy." Curr Gene Ther **3**(4): 281-304.

Hickman, A. B., Ronning, D. R., Perez, Z. N., Kotin, R. M. and Dyda, F. (2004). "The nuclease domain of adeno-associated virus rep coordinates replication initiation using two distinct DNA recognition interfaces." Mol Cell **13**(3): 403-14.

Hoque, M., Ishizu, K., Matsumoto, A., Han, S. I., Arisaka, F., Takayama, M., Suzuki, K., Kato, K., Kanda, T., Watanabe, H. and Handa, H. (1999). "Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation." J Virol **73**(9): 7912-5.

Hoque, M., Shimizu, N., Ishizu, K., Yajima, H., Arisaka, F., Suzuki, K., Watanabe, H. and Handa, H. (1999). "Chimeric virus-like particle formation of adeno-associated virus." Biochem Biophys Res Commun **266**(2): 371-6.

Hu, Y. and Bentley (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.

Hu, Y. and W., B. (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.

- Hunter, L. A. and Samulski, R. J. (1992). "Colocalization of adeno-associated virus Rep and capsid proteins in the nuclei of infected cells." J Virol **66**(1): 317-24.
- Kaplitt, M. G., Leone, P., Samulski, R. J., Xiao, X., Pfaff, D. W., O'Malley, K. L. and Durning, M. J. (1994). "Long-term gene expression and phenotypic correction using adeno-associated virus vectors in the mammalian brain." Nat Genet **8**(2): 148-54.
- Kato, H., Suzuki, M., Fujita, K., Horie, M., Endoh, S., Yoshida, Y., Iwahashi, H., Takahashi, K., Nakamura, A. and Kinugasa, S. (2009). "Reliable size determination of nanoparticles using dynamic light scattering method for in vitro toxicology assessment." Toxicol In Vitro.
- Kern, A., Schmidt, K., Leder, C., Muller, O. J., Wobus, C. E., Bettinger, K., Von der Lieth, C. W., King, J. A. and Kleinschmidt, J. A. (2003). "Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids." J Virol **77**(20): 11072-81.
- Kessler, P. D., Podsakoff, G. M., Chen, X., McQuiston, S. A., Colosi, P. C., Matelis, L. A., Kurtzman, G. J. and Byrne, B. J. (1996). "Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(24): 14082-7.
- Kronenberg, S., Bottcher, B., von der Lieth, C. W., Bleker, S. and Kleinschmidt, J. A. (2005). "A conformational change in the adeno-associated virus type 2 capsid leads to the exposure of hidden VP1 N termini." J Virol **79**(9): 5296-303.
- Lai, C. M., Lai, Y. K. and Rakoczy, P. E. (2002). "Adenovirus and adeno-associated virus vectors." DNA Cell Biol **21**(12): 895-913.
- Licari, P. and Bailey, J. E. (1992). "Modeling the population dynamics of baculovirus-infected insect cells: Optimizing infection strategies for enhanced recombinant protein yields." Biotechnol Bioeng **39**(4): 432-41.
- Lux, K., Goerlitz, N., Schlemminger, S., Perabo, L., Goldnau, D., Endell, J., Leike, K., Kofler, D. M., Finke, S., Hallek, M. and Buning, H. (2005). "Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking." J Virol **79**(18): 11776-87.
- Marie, D., Brussaard, C. P. D., Thyraug, R., Bratbak, G. and Vaulot, D. (1999). "Enumeration of marine viruses in culture and natural samples by flow cytometry." Appl Environ Microbiol **65**(1): 45-52.
- McCarty, D. M., Young, S. M., Jr. and Samulski, R. J. (2004). "Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors." Annu Rev Genet **38**: 819-45.
- McPherson, R. A. and Rose, J. A. (1983). "Structural proteins of adenovirus-associated virus: subspecies and their relatedness." J Virol **46**(2): 523-9.

Meghrou, J., Aucoin, M. G., Jacob, D., Chahal, P. S., Arcand, N. and Kamen, A. A. (2005). "Production of recombinant adeno-associated viral vectors using a baculovirus/insect cell suspension culture system: from shake flasks to a 20-L bioreactor." Biotechnol Prog **21**(1): 154-60.

Mena, J. A., Ramírez, O. T. and Palomares, L. A. (2006). "Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system." J Biotechnol **122**(4): 443-52.

O'Reilly, K., M. L. and A, L. V. (1994). "Baculovirus expression vectors: a laboratory manual." Ed. Oxford University Press: 3-29.

Opie, S. R., Warrington, K. H., Jr., Agbandje-McKenna, M., Zolotukhin, S. and Muzyczka, N. (2003). "Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding." J Virol **77**(12): 6995-7006.

Palomares, L. A., Estrada-Mondaca, S. and Ramírez, O. T. (2006). "Principles and applications of the insect-cell-baculovirus expression vector system." Cell culture technology for pharmaceutical and cellular therapies.

Palomares, L. A., Lopez, S. and Ramírez, O. T. (2002). "Strategies for manipulating the relative concentration of recombinant rotavirus structural proteins during simultaneous production by insect cells." Biotechnol Bioeng **78**(6): 635-44.

Redemann, B. E., Mendelson, E. and Carter, B. J. (1989). "Adeno-associated virus rep protein synthesis during productive infection." J Virol **63**(2): 873-82.

Rivera, V. M., Ye, X., Courage, N. L., Sachar, J., Cerasoli, F., Jr., Wilson, J. M. and Gilman, M. (1999). "Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(15): 8657-62.

Rose, J. A., Maizel, J. V., Jr., Inman, J. K. and Shatkin, A. J. (1971). "Structural proteins of adenovirus-associated viruses." J Virol **8**(5): 766-70.

Ruffing, M., Zentgraf, H. and Kleinschmidt, J. A. (1992). "Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells." J Virol **66**(12): 6922-30.

Shi, W., Hemminki, A. and Bartlett, J. S. (2006). "Capsid modifications overcome low heterogeneous expression of heparan sulfate proteoglycan that limits AAV2-mediated gene transfer and therapeutic efficacy in human ovarian carcinoma." Gynecol Oncol **103**(3): 1054-62.

Snyder, R. O., Miao, C. H., Patijn, G. A., Spratt, S. K., Danos, O., Nagy, D., Gown, A. M., Winther, B., Meuse, L., Cohen, L. K., Thompson, A. R. and Kay, M. A. (1997). "Persistent and therapeutic concentrations of human factor IX in mice after hepatic gene transfer of recombinant AAV vectors." Nat Genet **16**(3): 270-6.

Song, S., Morgan, M., Ellis, T., Poirier, A., Chesnut, K., Wang, J., Brantly, M., Muzyczka, N., Byrne, B. J., Atkinson, M. and Flotte, T. R. (1998). "Sustained secretion of human alpha-1-antitrypsin from murine muscle transduced with adeno-associated virus vectors." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(24): 14384-8.

Steinbach, S., Wistuba, A., Bock, T. and Kleinschmidt, J. A. (1997). "Assembly of adeno-associated virus type 2 capsids in vitro." J Gen Virol **78 (Pt 6)**: 1453-62.

Tsao, E. I., Mason, M. R., Cacciuttolo, M. A., Bowen, S. H. and Folena-Wasserman, G. (1996). "Production of parvovirus B19 vaccine in insect cells co-infected with double baculoviruses." Biotechnol Bioeng **49**(2): 130-8.

Urabe, M., Ding, C. and Kotin, R. M. (2002). "Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors." Hum Gene Ther **13**(16): 1935-43.

Van Vliet, K. M., Blouin, V., Brument, N., Agbandje-McKenna, M. and Snyder, R. O. (2008). "The role of the adeno-associated virus capsid in gene transfer." Methods Mol Biol **437**: 51-91.

Ward, P., Urcelay, E., Kotin, R., Safer, B. and Berns, K. I. (1994). "Adeno-associated virus DNA replication in vitro: activation by a maltose binding protein/Rep 68 fusion protein." J Virol **68**(9): 6029-37.

Warrington, K. H., Jr., Gorbatyuk, O. S., Harrison, J. K., Opie, S. R., Zolotukhin, S. and Muzyczka, N. (2004). "Adeno-associated virus type 2 VP2 capsid protein is nonessential and can tolerate large peptide insertions at its N terminus." J Virol **78**(12): 6595-609.

Wistuba, A., Kern, A., Weger, S., Grimm, D. and Kleinschmidt, J. A. (1997). "Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly." J Virol **71**(2): 1341-52.

Wistuba, A., Weger, S., Kern, A. and Kleinschmidt, J. A. (1995). "Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins." J Virol **69**(9): 5311-9.

Wong, K. T., Peter, C. H., Greenfield, P. F., Reid, S. and Nielsen, L. K. (1996). "Low multiplicity infection of insect cells with a recombinant baculovirus: The cell yield concept." Biotechnol Bioeng **49**(6): 659-66.

Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A. and Chapman, M. S. (2002). "The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(16): 10405-10.

Zadori, Z., Szelei, J., Lacoste, M. C., Li, Y., Garipey, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I. R. and Tijssen, P. (2001). "A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity." Dev Cell **1**(2): 291-302.