

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**DESARROLLO DE UN SISTEMA DE ENTREGA DE
SUSTANCIAS PARA CÉLULAS UTILIZANDO
PARTÍCULAS PSEDOVIRALES DE VIRUS
ADENO-ASOCIADO**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

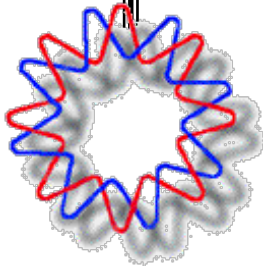
P R E S E N T A

Q.F.B. CUITLÁHUAC CHÁVEZ PEÑA

DIRECTORA DE TESIS

Dra. LAURA ALICIA PALOMARES AGUILERA

CUERNAVACA, MORELOS 2011





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 dirección de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera en el grupo del Dr. Octavio Tonatiuh Ramirez Reivich Durante la realización de este trabajo se conto con el apoyo económico de CONACyT (beca 269049) y de los proyectos SEP CONACyT (101847-Z) y PAPIIT-UNAM (IN223210 y, IN224409).

AGRADECIMIENTOS

Primero que nada al señor mi Dios por la vida y tiempo que me ha prestado para cumplir una etapa más de mi vida.

A mi excelente tutora la Dra Laura Palomares por el voto de confianza que me otorgo desde mi llegada a este laboratorio así como por las oportunidades de superación que me ha ofrecido durante estos años. Fue un honor y un gusto trabajar bajo su tutela

Al Dr. Tonatiuh Ramírez por la oportunidad de ingresar a su grupo de trabajo. Y como no, por la forma tan particular que tuvo de llamarme la atención en algunos momentos del postgrado

A las estimadísimas M en C. Vanessa Hernández y M en C Ruth Pastor, por el apoyo técnico y la paciencia que me brindaron durante toda la maestría. Gracias a ustedes he aprendido a ser un poco más ordenado en mi trabajo.

A Karin Levy por ser todo un ejemplo a seguir; por su carácter, entrega y eficiencia. Gracias por tu ayuda y por hacer tan llevadera la estancia en el lab.

A toda la banda ruda del laboratorio OTR: Liliana “la chikis”, Itzcoatl, William “calamardo”, Lili, Gheoghe Borja, Oriana “la china”, Martha Alicia, Ioatzin y a los OTR honorarios: Ricardo “caleño”, Mauricio, Toño. A todos gracias por sus consejos y su amistad. Tuvimos nuestras coincidencias y respectivos desacuerdos pero al final todo quedo en un muy agradable recuerdo. Espero sigamos por este camino construyendo un mundo mejor.

A la comunidad del volleyball: Gilda, Héctor, Itzcoatl, Baldemar, Alexis y Jesús. Gracias por tantos sábados que dedicados juntos al mejor deporte del mundo.

Al Dr. Yimmy Mena y al Dr Amine Kamen del Biotechnology Research Institute, Montreal, Canadá por la donación de partículas pseudovirales.

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

Dra Gloria Saab

Dr. Tomas López

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

Dr. Leobardo Serrano

Dra. Brenda Balderrama

Dr. Ramón Gonzales

Dr. Pavel Isa

Dr. Luis de Pozo

Al Instituto de Biotecnología de la UNAM, a Gloria y Toño de la unidad de docencia por todo su apoyo y sus atenciones. A la Dra Guadalupe Zavala de la Unidad de Microscopia. A la Dra. Alba Lecona del Instituto Nacional de Salud Pública.

DEDICATORIA

A mi señora madre: Rosario Peña. Gracias mama por haberme llevado a lo largo de los años por este camino del bien. El amor, la dedicación, la educación y los regaños que me has dado fueron pieza fundamental para la formación de la persona que ahora soy. Un gran abrazo. !!!!Eres la onda!!!!.

A mis hermanos Quetzal “chino” y Netzal “machin”. Gracias chavos por estar ahí en las buenas y en las malas. Ha sido todo un gusto verlos crecer a mi lado como hombres y como profesionistas. Y de todo corazón gracias por ayudarme a forjar el carácter que ahora tengo. Es un hecho que defenderse de ustedes dos es una hazaña titánica. Un abrazo

A Berenice Ochoa por tanto años que estuvimos lado a lado y que nos ayudaron a llegar hasta donde estamos. Es todo un honor tener una amiga como tú.

Quiero dedicar también este trabajo a todos los habitantes de este país que me ha visto nacer crecer y esperemos, también me vea morir. Hay gente muy valiosa en esta tierra y sería todo un orgullo que este trabajo llegara a aportar algo al desarrollo de al menos un mexicano o mexicana más.

“La verdad os hará libres”

Juan 8:23

ÍNDICE

	ÍNDICE	i
	ÍNDICE DE TABLAS	iv
	ÍNDICE DE FIGURAS	iv
	NOMENCLATURA	vii
CAPITULO 1	RESUMEN	1
CAPITULO 2	INTRODUCCIÓN	3
CAPITULO 3	ANTECEDENTES	6
	3.1 Producción de partículas pseudovirales	6
	3.1.1 Sistema células de insecto baculovirus	7
	3.1.2 Parámetros que influyen en la producción de proteínas recombinantes en el SCI-B	8
	3.2 Virus adeno-asociado	9
	3.2.1 Generalidades	9
	3.2.2 Biología y epidemiología	9
	3.2.3 Cápside y proteínas estructurales	12
	3.3 Aplicaciones biomédicas de las partículas pseudovirales (PPV)	16
	3.3.1 Estrategias para el desarrollo de sistemas de entrega de sustancias basados en PPV	18
	3.4 Dispersión dinámica de luz (DLS)	22
	3.5 Potencial zeta (ζ)	24
CAPITULO 4	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	27
	4.1 Hipótesis	27
	4.2 Objetivos generales	27
	4.3 Objetivos específicos	27
CAPITULO 5	MATERIALES Y MÉTODOS	28
	5.1 Líneas celulares, medio de cultivo y condiciones de cultivo	28
	5.2 Aislamiento de placas virales	28
	5.3 Amplificación de resguardos virales	29
	5.4 Determinación de títulos virales	30
	5.5 Producción de proteínas recombinantes y PPV-VAA por dos líneas celulares	31

5.6 Purificación de PPV-VAA	31
5.6.1 Selección de pH para cromatografía de intercambio aniónico	31
5.6.2 Cromatografía de intercambio aniónico	32
5.6.3 Centrifugación isopícnica en iodixanol o CsCl	33
5.7 Determinación de proteína total	33
5.8 Electroforesis desnaturalizante y Western blot	34
5.9 Dot-blot	35
5.10 Electroforesis en condiciones nativas	35
5.11 Cuantificación de PPV de VAA	36
5.12 Microscopia electrónica	36
5.13 Sonicación	37
5.14 Mediciones de tamaño de partícula	37
5.15 Determinación de potencial zeta (ζ)	38
5.16 Fluorescencia	38
CAPITULO 6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	39
6.1 Estrategia experimental	39
6.2 Amplificación de resguardos virales	40
6.3 Evaluación de la producción de PPV-VAA en dos líneas celulares	40
6.3.1 Cinéticas de crecimiento	41
6.3.2 Producción de proteína total	43
6.3.3 Producción de proteína de la cápside de VAA (VP)	44
6.3.4 Producción de PPV-VAA	47
6.4 Purificación de PPV-VAA	49
6.4.1 Selección de pH para la purificación por intercambio aniónico	50
6.4.2 Cromatografía de intercambio aniónico	52
6.4.3 Centrifugación isopícnica	55
6.5 Análisis de PPV-VAA mediante cromatografía de exclusión en gel absoluta	58
6.6 Caracterización fisicoquímica de PPV-VAA	62
6.6.1 Distribución de tamaño de PPV-VAA en soluciones con diferentes fuerzas iónicas.	63
6.6.2 Efecto de la temperatura sobre el tamaño de las PPV-VAA	66
6.6.3 Efecto de la temperatura de incubación sobre el potencial zeta de las PPV-VAA	77
6.6.4 Efecto del pH sobre la estructura de las PPV-VAA	80

6.6.5	Sonicación de muestras con PPV-VAA	86
6.7	Incorporación de fluoresceína a PPV-VAA	88
CAPITULO 7	CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	95
	REFERENCIAS	93
	ANEXOS	105
Anexo A	Concentración de proteína soluble en muestras de extracto celular y sobrenadante	105
Anexo B	Rendimientos de proteína total por célula	105
Anexo C	Distribución de la proteína de VAA en sobrenadantes y extractos celulares	106
Anexo D	Tinción con plata de geles con muestras de PPV-VAA	106
Anexo E	Espectro de absorción de muestras de PPV-VAA a diferente temperatura	107
Anexo F	Artículo publicado	108

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Características generales de algunos serotipos de VAA	11
Tabla 2	Composición, fuerza iónica y pH de soluciones utilizadas para la diafiltración - concentración de PPV-VAA	63

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Producción de proteínas recombinante en el sistema células de insecto-baculovirus	7
Figura 2.	Distribución de Poisson para la infección por baculovirus	8
Figura 3.	Mapa genético y transcripcional del VAA	10
Figura 4.	Modelo de la entrada de VAA a la célula	12
Figura 5.	Estructura tridimensional de la proteína VP3 del VAA	14
Figura 6.	Representación de la cápside de VAA	15
Figura 7.	Características topológicas de la cápside de VAA	15
Figura 8.	Representación de las posibles modificaciones de una PPV	16
Figura 9.	Generación de imágenes intravitalas mediante nanopartículas	17
Figura 10.	Expansión radial del CCMV	18
Figura 11.	Encapsidación de proteína verde fluorescente en PPV de poliomavirus	19
Figura 12.	Análisis de la funcionalización de PPV de poliomavirus	20
Figura 13.	Funcionalización de proteínas de choque térmico	21
Figura 14.	Interacción de un haz de luz con una partícula en suspensión	22
Figura 15.	Determinación del tamaño de partícula mediante DLS	23
Figura 16.	Distribución de densidad de carga y concentración de iones en los alrededores de una partícula en suspensión	24
Figura 17.	Esquema de la doble capa de iones que rodea a una partícula en suspensión	25
Figura 18.	Curva estándar para la cuantificación de PPV de VAA mediante ELISA	36
Figura 19.	Cinéticas de crecimiento de células Sf9 y High Five TM	42
Figura 20.	Cinéticas de producción de proteína total	44
Figura 21.	Western blot de la detección de proteínas de la cápside de VAA en muestras de extracto celular y sobrenadante	45

Figura 22.	Cinética de producción de la proteína de la cápside de VAA	46
Figura 23.	Rendimientos de proteína recombinante de VAA por mg de proteína total en cultivos de células de insecto	47
Figura 24.	Concentración de PPV-VAA en cultivo de células de insecto	48
Figura 25.	Efecto del pH sobre la unión de proteína total y PPV-VAA a la resina de intercambio aniónico	51
Figura 26.	Western blot de muestras de las etapas de elución 3, 4 y 5	52
Figura 27.	Cromatograma de la purificación de PPV-VAA mediante intercambio aniónico	53
Figura 28.	Análisis mediante Western blot de la distribución de proteínas VP de VAA durante la purificación mediante intercambio aniónico	54
Figura 29.	Purificación de PPV-VAA mediante centrifugación isopícnica en iodixanol	56
Figura 30.	Tinción de plata y Western blot de muestras obtenidas a partir de distintas etapas del proceso de purificación	57
Figura 31.	Cromatograma típico del análisis mediante cromatografía de exclusión en gel de muestras de PPV-VAA	60
Figura 32.	Detección de PPV-VAA mediante dot blot en fracciones colectadas durante la cromatografía de exclusión en gel absoluta	60
Figura 33.	Perfiles cromatográfico obtenidos mediante exclusión molecular de muestras de PPV-VAA purificadas mediante diferentes técnicas	62
Figura 34.	Distribuciones de tamaño de muestras de PPV-VAA diafiltradas y concentradas	65
Figura 35.	Análisis preliminar del efecto de la temperatura sobre el tamaño de PPV-VAA	67
Figura 36.	Inmunodetección de PPV-VAA con Mab A20	68
Figura 37.	Cambios en la intensidad de luz dispersada y t el tamaño de PPV-VAA durante su incubación a diferentes temperaturas.	69
Figura 38.	Distribución de tamaño de partícula en muestras de PPV-VAA a diferentes temperaturas	70
Figura 39.	Análisis mediante Dot-blot y microscopia electrónica de muestras de PPV-VAA a diferentes temperaturas	71
Figura 40.	Análisis mediante DLS demuestras incubadas a 61°C	72
Figura 41.	Tamaño de partícula de la población más pequeña detectada durante el enfriamiento de muestras de PPV-VAA post incubación a 61°C	73
Figura 42.	Resultado de la exposición de PPV-VAA a oscilaciones de temperatura	75
Figura 43.	Mediciones de conductividad y ζ de muestras con PPV-VAA a diferentes temperaturas	78
Figura 44.	Efecto de la temperatura sobre el ζ obtenidos en dos experimentos diferentes	79
Figura 45.	Análisis mediante DLS de PPV-VAA a diferentes valores de pH	81
Figura 46.	Determinaciones del tamaño de partícula de PPV-VAA a diferentes valores de pH	82

Figura 47.	Micrografías electrónicas de PPV-VAA incubadas a distintos pH	83
Figura 48.	Mediciones de fluorescencia de PPV-VAA a diferentes valores de pH	85
Figura 49.	Cambios en la abundancia relativa de dos poblaciones en muestras de PPV-VAA después de varios ciclos de sonicación	87
Figura 50.	Cambios en D_H promedio y modal de dos poblaciones de partículas presentes en muestras de PPV-VAA después de varios ciclos de sonicación	87
Figura 51	Modelos de un poro presente en el eje de simetría pentaxial de PPV-VAA	88
Figura 52	Análisis mediante exclusión molecular de PPV-VAA incubadas en presencia de fluoresceína	89
Figura 53	Espectros de absorción y distribución de tamaño de partícula de PPV de VAA a 25 y 61°C	91

NOMENCLATURA

AAP	Proteína auxiliar del ensamblaje de virus adeno-asociado
ASEC	Cromatografía de exclusión en gel absoluta
b	bases
Bac Cap	Baculovirus recombinante que codifica para las proteínas de la cápside de VAA
CCI	Concentración celular del cultivo al tiempo de la infección
CCMV	Virus del moteado clorótico del frijol
CPMV	Virus del mosaico del frijol
cél/ml	Concentración de células por mililitro
CPV	Parvovirus canino
d	Coefficiente de difusión
D_H	Diámetro hidrodinámico
DLS	Dispersión dinámica de luz
gp64	Glicoproteína de la envoltura lipídica del baculovirus
hpi	Horas post infección
I_{ld}	Intensidad de luz dispersada
kcps	Kilo conteos por segundo
kb	Kilo bases
kpb	Kilo pares de bases
MDI	Multiplicidad de infección
MWCO	Peso molecular de corte
n	Índice de refracción
N.D.	No identificado
PPV	Partículas pseudovirales
SCI-B	Sistema células de insecto baculovirus
SFB	Suero fetal bovino
TDI	Tiempo de infección
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TMV	Virus del mosaico de tabaco
ufp	Unidades formadoras de placa
VAA	Virus adeno-asociado
VP	Proteína viral
VP1,VP2,	Proteínas de la cápside de virus adeno-asociado

VP3

ufp	Unidad formadora de placa
η	Viscosidad
ρ	Densidad
ρ_P	Valor de correlación de la prueba producto momento de Pearson
ζ	Potencial zeta

CAPITULO 1

RESUMEN

Los trabajos en las áreas médico biológica tales como diagnóstico, terapéutica e investigación recurren frecuentemente a la introducción de sustancias químicas en organismos vivos y células. La nanobiotecnología ha generado nuevas alternativas para este fin mediante la funcionalización de diferentes nanomateriales, entre ellos las partículas pseudovirales. El virus adeno-asociado ha sido ampliamente usado como vector para terapia génica y algunas de las características de las partículas pseudovirales derivadas de este virus representan un atractivo para el desarrollo de sistemas de entrega de sustancias a partir de estas partículas pseudovirales. En este trabajo nos dimos a la tarea de llevar a cabo una caracterización fisicoquímica de las partículas pseudovirales de virus adeno-asociado con miras a proponer estrategias de funcionalización que permitirían desarrollar sistemas de entrega de sustancias a partir de las partículas formadas por las proteínas estructurales del virus adeno-asociado.

Se estudió la producción de proteína viral y partículas pseudovirales de virus adeno-asociado en dos líneas celulares de insecto con la finalidad de seleccionar una línea capaz de producir grandes cantidades de partículas. Se encontró que las células High FiveTM producen un 50% más partículas pseudovirales de virus adeno-asociado que las células Sf9. Se desarrolló un método de purificación para estas partículas mediante cromatografía de intercambio iónico y centrifugación isopícnica en iodixanol que permitió alcanzar purezas del 99%.

Con las partículas pseudovirales purificadas se llevó a cabo un estudio de los cambios estructurales y estabilidad de las mismas frente a cambios de temperatura, pH, fuerza iónica y sonicación. El uso de dispersión dinámica de luz, permitió determinar que el mantenimiento de las partículas en estado desagregado requiere soluciones de citrato de

sodio con una fuerza iónica superior a 200 mM. De igual manera, mediante dispersión dinámica de luz se encontró que la sonicación permite eliminar los agregados de partículas pseudovirales de virus adeno-asociado, sin que el tratamiento ocasione cambios conformacionales en las partículas. Los análisis de dispersión dinámica de luz, inmunodetecciones y espectroscopía permitieron determinar que las partículas pseudovirales son estables a la exposición a una temperatura de 59°C hasta por una hora, que el calentamiento a 61°C produce un cambio conformacional que va acompañado por un aumento en el tamaño de las partículas y que la incubación a temperaturas de 65°C ocasiona el desensamblaje de las partículas pseudovirales y la agregación irreversible de las proteínas que las forman. El efecto del pH sobre la estructura de las partículas pseudovirales fue estudiado mediante microscopía electrónica, dispersión dinámica de luz y espectroscopía de fluorescencia. Con estas técnicas fue posible detectar que las partículas pseudovirales sufren un cambio conformacional en respuesta a la disminución del pH desde 8.0 hasta 4.5 y que dicho cambio incrementa la permeabilidad de las mismas.

A partir de los resultados obtenidos durante la caracterización fisicoquímica se propuso una estrategia para lograr la introducción de fluoresceína en el seno de las partículas pseudovirales, aprovechando la presencia de poros en los ejes de simetría pentaxial de las partículas y el cambio conformacional observado durante el calentamiento a 61°C. La estrategia propuesta no permitió lograr la funcionalización de las partículas pseudovirales.

El conjunto de conocimientos generados en este trabajo permitirán proponer otras estrategias para la incorporación de moléculas al interior de las partículas pseudovirales de virus adeno-asociado que rindan mejores resultados que los obtenidos en este primer intento por generar un sistema de entrega basado en partículas pseudovirales de virus adeno-asociado.

CAPITULO 2

INTRODUCCIÓN

La administración de sustancias químicas a individuos, tejidos o células representa un tema de especial interés en las áreas medico biológicas, tanto para fines de investigación como de diagnóstico y terapéutica. Este interés ha motivado el desarrollo de dispositivos y técnicas que permitan depositar una sustancia en regiones específicas de las células u organismos bajo condiciones controladas. Ejemplo de dichos desarrollos incluyen la electroporación y la microinyección ampliamente utilizadas en los laboratorios de investigación, así como los sistemas de liberación de drogas empleados para la fabricación de medicamentos.

Los sistemas de entrega de drogas o sustancias se definen tradicionalmente como toda formulación o dispositivo que permite: la introducción de una sustancia a un organismo y una mejora en su eficacia y seguridad mediante el control en su tasa, tiempo y lugar de liberación en el organismo [1]. El desarrollo de estos sistemas ha permitido dar solución a algunos de los problemas que se presentan durante la formulación de medicamentos. Dichos problemas son derivados de la baja solubilidad, toxicidad o inestabilidad fisicoquímica de diversas sustancias químicas con aplicaciones potenciales como fármacos o agentes de diagnóstico [2,3].

La tendencia a disminuir el tamaño de los sistemas de entrega de sustancias y los desarrollos logrados en el área de la nanotecnología durante los últimos 30 años han permitido que diferentes nanoestructuras sean utilizadas como plataformas para el desarrollo de novedosos sistemas de entrega de sustancias [4]. Nanoestructuras como liposomas^a, nanopartículas poliméricas, dendrímeros^b, nanotubos de carbono, y partículas pseudovirales entre otras, han sido empleadas para la entrega de fármacos convencionales,

^a Vesículas de fosfolípidos formadas espontáneamente a partir de la dispersión de un lípido en agua.

^b Nanoestructuras tridimensionales formadas por la adición repetida de pequeñas moléculas ramificadas sobre una molécula central.

así como de proteínas y material genético, tanto a modelos animales como a seres humanos en ensayos clínicos [5].

Los sistemas de entrega de sustancias químicas deben cubrir varias características; tener un tamaño y forma definidos, ser monodispersos, presentar una elevada compatibilidad biológica, baja inmunogenicidad, ser biodegradables, brindar protección a la sustancia que transportan, así como tener la capacidad de unirse e internalizarse en la célula blanco para exponer o liberar la sustancia que transportan [1]. La naturaleza química y metodologías de producción de la mayoría de las nanoestructuras suelen ser una limitante para cumplir con algunas de estas características. Sin embargo, las partículas pseudovirales (PPV), estructuras físicamente similares a un virus formadas por las proteínas de la cápside viral pero que carecen de material genético, cumplen con la gran mayoría de las características antes mencionadas dadas su naturaleza proteica y el alto grado de monodispersión que presentan [6].

El desarrollo de sistemas de entrega a partir de PPV presenta algunas ventajas en comparación con el uso de nanopartículas de origen sintético. Las PPV pueden ser modificadas genética y químicamente y debido a su estructura simétrica las modificaciones en su superficie presentan una distribución espacial bien definida [6]. Naturalmente poseen una estructura similar a una jaula y pueden ser usadas como contenedores, disminuyendo de esta manera la toxicidad de la sustancia que transportan y brindándole protección contra el ambiente en el que se suspende la PPV [7,8]. Su tamaño (10-200 nm) les permite difundir a través de las paredes de los capilares. Además, de forma natural algunas poseen tropismo celular específico, lo que les permite dirigirse a un órgano o tejido en particular una vez que han abandonado el torrente circulatorio [9]. Esta última característica permite disminuir la cantidad de sustancia a suministrar para alcanzar el efecto deseado.

Para llevar a cabo la incorporación de las sustancias químicas en PPV, proceso que en ocasiones es denominado funcionalización, es necesario tener un profundo conocimiento sobre la secuencia proteica, estructura tridimensional, reactividad química y estabilidad fisicoquímica de la PPV a funcionalizar. Con base en este conocimiento es posible proponer estrategias y llevar a cabo experimentos que permitan tanto la incorporación de la

sustancia de interés como preservar la estructura y funcionalidad de la partícula contenedora.

En este trabajo se estudió el comportamiento de partículas pseudovirales de virus adeno-asociado bajo las condiciones fisicoquímicas que suelen ser empleadas para la funcionalización de bionanopartículas. Esto con el fin de proponer una metodología para el desarrollo de sistemas de entrega de sustancias químicas basado en partículas pseudovirales de virus adeno-asociado.

CAPITULO 3

ANTECEDENTES

3.1 PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS PSEUDOVIRALES

La ciencia ha encontrado en las PPV una materia prima muy versátil. En los últimos años han sido empleadas en diferentes áreas de aplicación para el desarrollo de nuevos dispositivos electrónicos, catalizadores y agentes de vacunación, entre otros [6]. En respuesta a este interés por desarrollar tecnologías a partir de PPV, diferentes grupos de trabajo se han dado a la tarea de generar sistemas de expresión, y métodos de producción que permitan obtener grandes cantidades de estas estructuras proteicas.

Los sistemas de expresión usados actualmente para la producción de partículas pseudovirales son varios, entre ellos podemos encontrar: 1) células procariotas, particularmente *E. coli*; 2) varias especies de levaduras; 3) plantas de tabaco, papa y soya; 4) sistema células de insecto-baculovirus; y 5) varias líneas celulares de mamíferos [10,11]. La elección de uno u otro sistema depende en gran medida del grado de complejidad estructural de la PPV a producir y requiere valorar adecuadamente las fortalezas y debilidades de cada sistema para lograr así un equilibrio entre el costo, tiempo de producción y calidad del producto de interés.

El sistema células de insecto baculovirus (SCI-B) es una opción atractiva para la producción de PPV, ya que posee una adecuada combinación de las ventajas de otros sistemas: 1) El cultivo de células de insecto es más económico que el de células de mamífero; 2) no requiere del uso de suplementos derivados de animales lo cual minimiza la incorporación de patógenos oportunistas; 3) las proteínas pueden sufrir modificaciones postraduccionales que no se pueden llevar a cabo en bacterias o levaduras; 4) Los niveles de expresión son mayores a los obtenidos en plantas o células de mamífero; 5) Es posible coexpresar hasta 5 proteínas diferentes lo que permite la producción de PPV complejas [11-13].

3.1.1 Sistema Células de Insecto Baculovirus

El SCI-B consiste en utilizar un baculovirus, virus con un rango de hospedero restringido a artrópodos, como vector para entregar un gen de interés a células de insecto cultivadas *in vitro* (**Figura 1**). El baculovirus nucleopoliedrovirus de multicápside de *Autographa californica* (AcMNPV) es el más utilizado. Este virus posee un genoma de 131 kpb y contiene uno de los promotores más fuertes que se conocen, el promotor *polh*, el cual regula la expresión de la proteína poliedrina durante la fase tardía del ciclo de infección [14]. Esta proteína es esencial para la propagación del virus en la naturaleza mas no para su propagación en cultivos *in vitro*. Aprovechando esta característica, es posible construir baculovirus recombinantes mediante la sustitución del gen de poliedrina por el gen de interés, dejando el control de la expresión del gen recombinante al promotor *polh*. El uso de este promotor permite alcanzar concentraciones de proteína recombinante que pueden llegar a ser de hasta el 50% de la proteína total en los cultivos [15].

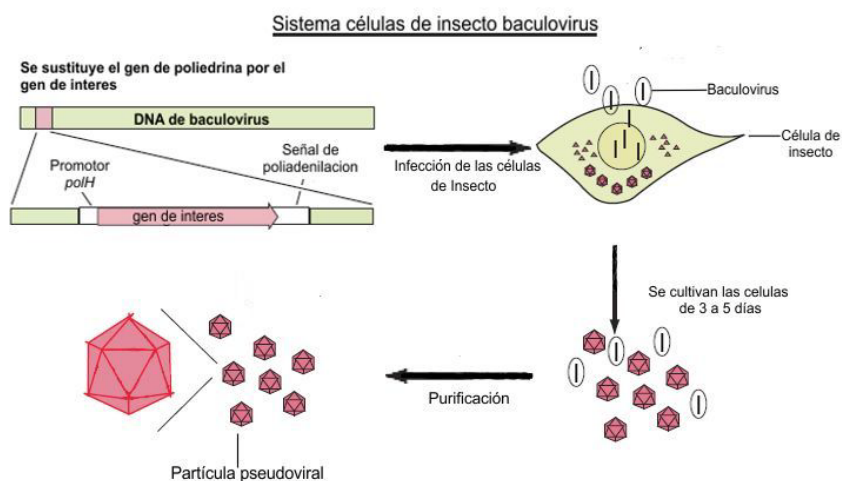


Figura 1-Producción de proteínas recombinante en el sistema células de insecto-baculovirus

La producción de proteínas recombinantes en este sistema es un proceso de dos etapas. Inicialmente, se cultivan las células de insecto hasta obtener la concentración celular deseada (concentración celular al tiempo de infección, CCI). Entonces se agrega un volumen del resguardo de baculovirus recombinante que contiene la cantidad de partículas infecciosas (unidades formadoras de placa, ufp) necesaria para infectar al cultivo con la

multiplicidad de infección (MDI, número de partículas virales infecciosas adicionadas por cada célula en el cultivo) deseada [16].

3.1.2 Parámetros que influyen en la producción de proteínas recombinantes en el SCI-B

Las variaciones de los rendimientos obtenidos para diferentes proteínas recombinantes en el SCI-BV han sido atribuidas a factores genéticos, de clonación, a condiciones del cultivo celular, y al proceso de infección. Las variables relacionadas con el proceso de infección: multiplicidad de infección (MDI), tiempo de infección (TDI) y tiempo de cosecha (TDC), son las que se manipulan con mayor facilidad y tienen un impacto significativo en los rendimientos obtenidos [17,18]. La MDI se define como el número de partículas infecciosas (ufp) adicionadas al cultivo por cada célula presente en el mismo. La MDI utilizada determina la fracción de células infectadas al inicio del cultivo; esta relación puede ser modelada mediante la distribución de Poisson (**Figura 2**).

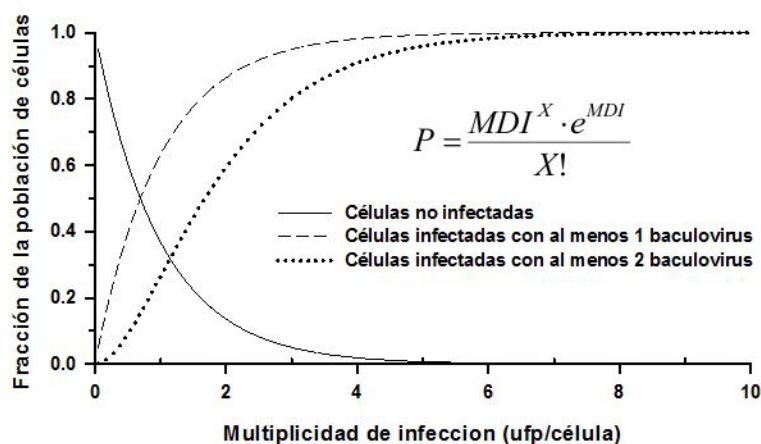


Figura 2.- Distribución de Poisson. Se grafica el efecto que tiene la MDI sobre la fracción de la población que recibe una cantidad (X) de baculovirus en la infección inicial.

El TDI suele ser expresado como la concentración celular del cultivo al tiempo de la infección (CCI). Debido a que el TDI indica la edad del cultivo (fase lag, exponencial o estacionaria) y nos da una idea del nivel de nutrientes y productos de desecho presentes en el medio de cultivo, es lógico esperar que tenga un efecto sobre los rendimientos obtenidos en la producción de proteína recombinante.

Estas tres variables están interrelacionadas y tienen un efecto interdependiente no lineal sobre la productividad del sistema [19], razón por la cual para cada proteína a producir debe

de identificarse la MDI, CCI y TDC más adecuados. Gallo reportó que la mayor productividad de PPV de VAA en el SCI-BV se obtiene al infectar células de insecto a una concentración de 1×10^6 células/ml con una MDI de 0.1 ufp/célula [20].

3.2 VIRUS ADENO-ASOCIADO

3.2.1 Generalidades

El virus adeno-asociado (VAA) pertenece al género *Dependovirus* de la familia *Parvoviridae* [21]. Como el nombre del género lo indica, estos virus requieren coinfectar con un virus auxiliar (Ej, adenovirus, herpesvirus) para poder llevar a cabo una infección productiva [22]. El tamaño reportado del VAA varía de los 18 a los 25 nm [23].

Su material genético es ADN de cadena sencilla con un tamaño de aproximadamente 4.6 kb y codifica para 8 proteínas; cuatro proteínas, rep 78, rep 68, rep 52 y rep 40, necesarias para la replicación, integración y encapsidación del genoma viral, tres proteínas estructurales (las proteínas estructurales forman la cápside viral) VP1, VP2 y VP3 y una proteína auxiliar en el proceso de ensamblaje de la cápside (assembly-activating protein, AAP) [24]. El ADN del VAA posee secuencias nucleotídicas cortas (145 pb) en ambos extremos, conocidas como repeticiones terminales invertidas (Inverted terminal repetitions, ITR's). Las ITR's son necesarias para la integración sitio específica del genoma viral (en el cromosoma 19 posición 19q13.3) en células humanas [25]. La capacidad del VAA de integrar su genoma en células infectadas ha sido aprovechada para el desarrollo de vectores para terapia génica [26]. En la **figura 3** se muestra la organización del material genético del VAA.

3.2.2 Biología y epidemiología

Un total de catorce serotipos de VAA han sido identificados, aislados y secuenciados; todos ellos provenientes de roedores y primates, tanto humanos como no humanos [22]. Todos los serotipos comparten gran similitud en la secuencia y estructura de sus cápsides y en la organización de su material genético. Las diferencias más notorias entre los distintos serotipos son la especificidad tisular que poseen y el uso de diferentes receptores de membrana para ingresar a la célula (**Tabla 1**). El virus adeno-asociado tipo 2 (VAA-2)

es el más ampliamente caracterizado y el más empleado en ensayos clínicos [27]. La importancia del estudio de los demás serotipos radica en la posibilidad de emplear sus proteínas en la producción de cápsides híbridas y así ampliar las capacidades de transducción de las partículas pseudovirales de virus adeno-asociado (PPV-VAA).

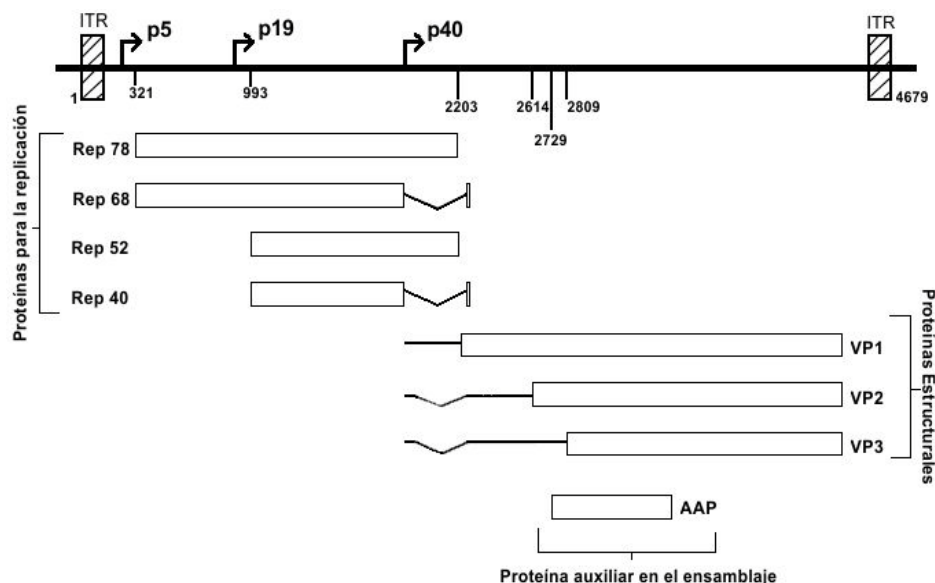


Figura 3.- Mapa genético del VAA. ITR son las repeticiones invertidas repetidas presentes en los extremos del genoma viral. Los promotores p5 y p19 regulan la expresión de las proteínas relacionadas con los procesos de replicación y encapsidación del material genético mientras que el promotor p40 regula la expresión de las proteínas estructurales y de la proteína auxiliar.

El VAA se encuentra ampliamente distribuido entre los humanos. El 50 al 80% de la población posee anticuerpos específicos contra la cápside del VAA, principalmente contra el serotipo 2 [28,29]. Además, en un estudio realizado por Gao y colaboradores fue posible recuperar secuencias completas de VAA en el 20% de los tejidos humanos analizados (n=259) [30]. Sin embargo, a pesar de esta alta prevalencia, no se ha relacionado al VAA con alguna enfermedad humana, razón (entre otras) por la cual las PPV-VAA han ganado terreno frente a otros virus en el desarrollo de vectores administrados a humanos con fines terapéuticos [31].

La entrada del VAA a la célula (Figura 4) se lleva a cabo por endocitosis mediada por receptores. El receptor primario para la infección por VAA-2 es el heparan sulfato proteoglicano (HSPG) y los receptores secundarios propuestos incluyen el receptor del

factor de crecimiento de fibroblastos (FGFR-1), el receptor del factor de crecimiento de hepatocitos (HGRF), receptores de laminina, y un par de integrinas ($\alpha_v\beta_5$ y $\alpha_5\beta_1$) [32]. La secuencia proteica en regiones específicas de la cápside dicta en gran medida el tipo de receptor empleado para la internalización del VAA y se cree que también está relacionada con los fenómenos de desempaquetamiento.

Tabla1.- Características generales de algunos serotipos de VAA. [29]

Serotipo	Huésped Natural	Tamaño del genoma (b)	Receptor	Co-receptor	Afinidad tisular
VAA-1	Mono	4718	N.D.	ND	Musculo
VAA-2	Humano	4681	Heparan sulfato proteoglicano	$\alpha_v\beta_5/\alpha_5\beta_1$ *	Riñón
VAA-3	Humano	4722	Heparan sulfato proteoglicano	FGFR-1	ND
VAA-4	Mono	4767	2,3 O-acido siálico	PDGFR	SNC
VAA-5	Humano	4642	2,3 N-acido siálico	PDGFR	Retina
VAA-6	Humano	4683	Acido siálico	PDGFR	ND
VAA-7	Mono	4721	N.D.	ND	Musculo
VAA-8	Mono	4393	N.D.	Receptor de laminina	Páncreas

N.D. No identificado, SNC. Sistema Nervioso Central, FGFR-1 Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 1, PDGFR Receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, * Integrinas.

En experimentos realizados por Bartlett y colaboradores fue posible determinar que el 100% de los VAA que se adhieren a la membrana celular se internalizan en la célula en un período de 30 minutos [33]. Los endosomas son conducidos desde la periferia de la célula hacia el área perinuclear mediante reacomodos en el citoesqueleto. Se desconoce en qué punto de este trayecto el VAA es liberado del endosoma, pero gracias al trabajo de Kronenberg sabemos que la acidificación del endosoma provoca un cambio conformacional en la cápside que conduce a la liberación del VAA del endosoma [34].

Después de la liberación, las partículas comienzan a acumularse en el espacio perinuclear, además se ha reportado que los VAA liberados al citoplasma son susceptibles a sufrir ubiquitinación, lo que conduce a su degradación en el proteosoma. El mecanismo mediante el cual el genoma del VAA ingresa al núcleo es motivo de discusión [22] El resto del ciclo de replicación del VAA depende del estado de la célula así como de la presencia

de virus auxiliares, estos factores conducen a la integración del DNA viral en el genoma de la célula huésped o a la replicación del virus.

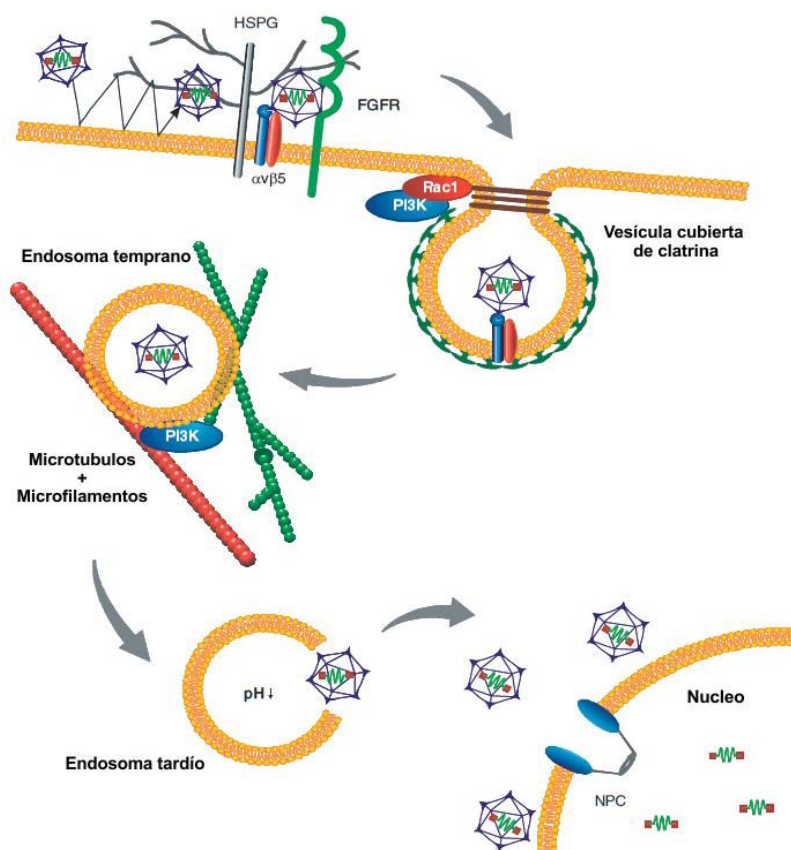


Figura 4.- Modelo de la entrada de VAA a la célula. El virus adeno-asociado se une al HSPG en la membrana celular. El proceso es asistido por correceptores. Acto seguido se lleva a cabo una endocitosis vía vesículas recubiertas de clatrina. Los endosomas son transportados hacia el núcleo. La acidificación de los endosomas dispara un cambio conformacional de la cápside y su liberación del endosoma. Mediante un mecanismo aún desconocido, el genoma del VAA ingresa al núcleo donde se replica o se integra en el genoma de la célula huésped (tomado de [22]).

3.2.3 Cápside y proteínas estructurales.

La cápside del VAA está formada por tres proteínas, VP1, VP2 y VP3. Estas son traducidas a partir de dos mensajeros diferentes expresados bajo el control del promotor p40. La expresión de las proteínas de la cápside requiere splicing alternativo y uso del poco habitual codón de inicio ACG [35]. Las tres proteínas se sintetizan usando el mismo marco de lectura abierto (ORF) y comparten el 72% de su secuencia de aminoácidos, la porción que es diferente es el extremo amino terminal. VP1 es la más grande de las tres proteínas (735 aminoácidos-87 kD), le sigue VP2 (598 aminoácidos-72 kD) y la más pequeña es VP3 (533 aminoácidos-62 kD) [36]. La relación estequiométrica reportada entre las tres

proteínas es 1:1:10 (VP1, VP2, VP3), con un total de 60 subunidades por cápside. Las funciones específicas y las necesidades de cada una de las tres proteínas virales en la formación de cápsides no son claras aún. Es posible formar PPV completas en sistemas que no expresan VP1, sin embargo la infectividad de las mismas es baja debido a que el dominio fosfolipasa presente en esta proteína es esencial para que la PPV pueda liberarse del endosoma durante la infección [34]. En el sistema células de insecto baculovirus, VP2 es esencial para la formación de cápsides completas [37], mientras que en células HEK 293 no lo es [38]. Además, en células HEK 293 es posible expresar VP2 con inserciones de péptidos pequeños en el extremo amino terminal, sin que esto afecte de forma negativa la formación de VLP's o la infectividad de las mismas. VP3 es la más abundante de las proteínas de la cápside, en algunos trabajos se reporta que no es posible formar cápsides que sólo contengan VP3 [39], debido a que esta proteína carece de señal de localización nuclear (SLN) y por lo tanto no puede ingresar al núcleo, en donde se sabe se lleva a cabo el ensamblaje de la cápside. Sin embargo, existe información contradictoria ya que otros autores han reportado la formación de cápsides solamente con VP3 [27,38].

Recientemente se reportó la existencia de una nueva proteína codificada en el genoma del VAA, la proteína AAP, la cual según los autores es esencial para la formación de las cápsides, ya que se encarga de transportar eficientemente a la proteína VP3 al interior del núcleo (sitio de formación de la cápside viral), además de participar activamente en el ensamblaje por un mecanismo aun desconocido. La proteína AAP está codificada en la misma región del material genético que codifica para las proteínas estructurales pero en un marco de lectura diferente y su expresión requiere el uso de un codón de inicio no convencional (CUG) [24]. El descubrimiento de esta nueva proteína puede representar una explicación para las contradicciones que se han reportado con respecto a la necesidad de las diferentes VP para la formación de cápsides.

La comparación de la secuencia de aminoácidos de las proteínas de la cápside en diferentes serotipos ha identificado 12 regiones hipervariables [40]. Diferentes grupos han trabajado sobre estas regiones haciendo mutagénesis dirigida o insertando péptidos pequeños con la finalidad de identificar qué aminoácidos son susceptibles a ser modificados sin afectar la capacidad de ensamblaje o la infectividad del virus [41,42]. La cápside tiene estructura icosaédrica con número de triangulación T=1. Cada subunidad posee una

estructura de barril β formado por 8 hebras antiparalelas (**Figura 5**) conectadas entre sí mediante largas asas [43]. La mayoría de estas asas se localizan en la superficie exterior de la cápside, corresponden a las regiones hipervariables, y son las responsables de la especificidad tisular y la antigenicidad de cada serotipo [39].

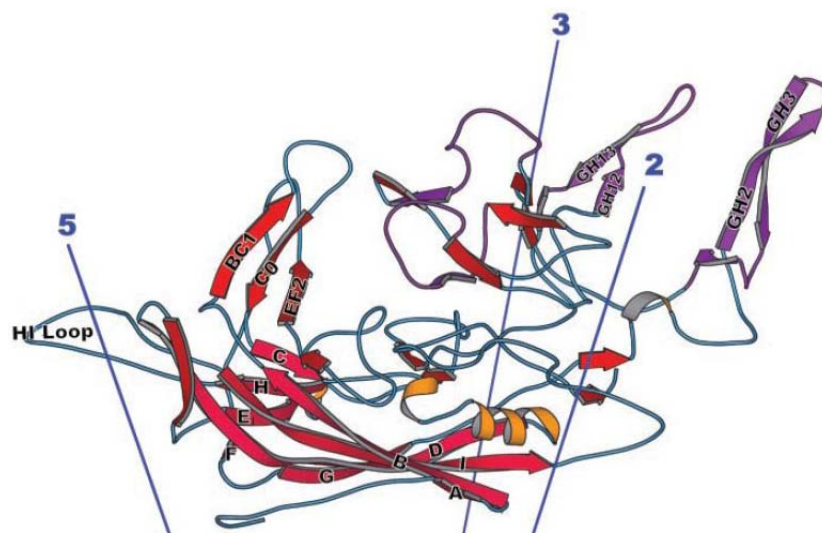


Figura 5.- Estructura tridimensional de la proteína VP3 del VAA. Las hebras antiparalelas (flechas rosas) forman el centro de la subunidad (barril β) y se nombran de la A a la I. Las asas son nombradas acorde a las hebras que las limitan por ejemplo asa G-H [43].

La estructura cristalográfica del virus [43] y los modelos generados mediante criomicroscopía electrónica [34,44] muestran las siguientes características de la cápside viral (**Figura 6**):

- Los extremos amino terminal de VP1 y VP2 se localizan en la superficie interna de la cápside sobre los ejes de simetría biaxiales. El extremo amino terminal de VP1 se desplaza hacia la superficie externa bajo condiciones ácidas o calentamiento moderado.
- En los ejes de simetría triaxiales, es posible observar protuberancias que se extienden aproximadamente 2 nm por encima de la superficie externa de la cápside. Estas protuberancias están formadas por la asociación de las asas G-H presentes en estos ejes de simetría y están involucradas en los procesos de reconocimiento celular (**Figura 7-a y b**). Se ha postulado que la estructura terciaria en estos ejes genera una barrera termodinámica contra el desensamblaje y contribuye a la estabilidad característica del VAA.

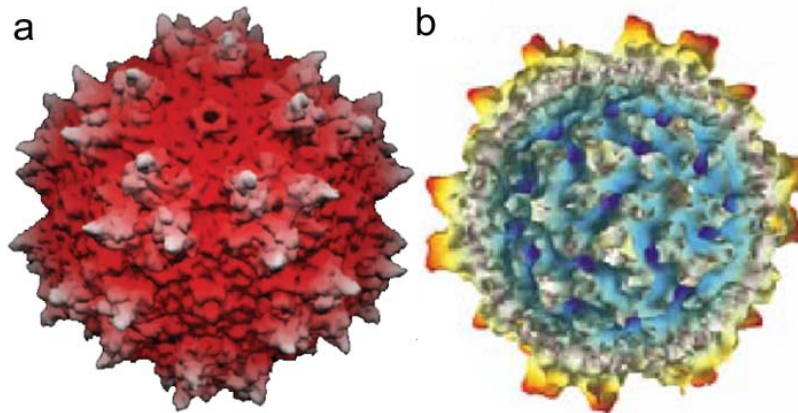


Figura 6.-Representacion de la cápside de VAA a) Imagen de la superficies externa del VAA obtenida mediante cristalografía (Xie et al., 2002) b) Imagen de la superficie interna obtenida mediante criomicroscopía electrónica [44].

- En los ejes de simetría pentaxiales se localizan canales flanqueados por 5 asas D-E. El diámetro de los canales varía desde 1.0 nm en la cara interna hasta 1.6 nm en la cara externa (**Figura 7-c**). Estos canales son el sitio a través del cual el extremo amino terminal de VP1 se expone en la superficie del virus. Además, se cree que a través de ellos se lleva a cabo el proceso de empaquetamiento del DNA.

Aún existen varias preguntas por responder con respecto a la importancia que las subestructuras presentes en la cápside de VAA tienen en los procesos de reconocimiento celular, ensamblaje, empaquetamiento y desempaquetamiento del VAA.

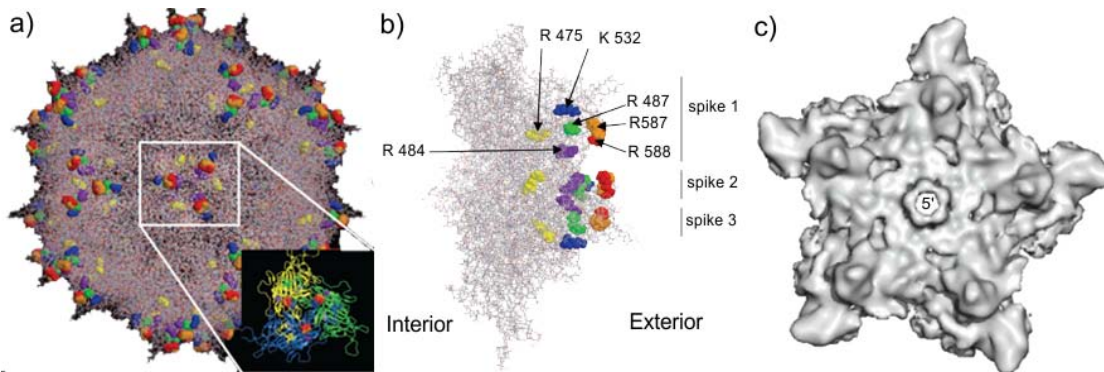


Figura 7.- Características topológicas de la cápside de VAA. a) Vista exterior de la cápside. En el recuadro se presenta un trímero presente en el eje de simetría triaxial, en color se indican los aminoácidos responsables de la unión a HSPG b) Ampliación y vista lateral del recuadro de la figura a [45] c) Pentámero visto a través del eje de simetría pentaxial de la cápside del VAA. Se observa el canal en el centro del pentámero [46].

3.3 APLICACIONES BIOMÉDICAS DE LAS PARTÍCULAS PSEUDOVIRALES (PPV)

Las partículas pseudovirales han sido utilizadas en los últimos años como componentes inmunogénicos de vacunas contra diversas enfermedades [7]. Otras aplicaciones potenciales de las PPV han comenzado a ser estudiadas. La capacidad natural de las PPV de funcionar como contenedores ha sido explotada en dos modalidades: la administración tejido específico de agentes terapéuticos tras la incorporación de fármacos en la PPV y la visualización de estructuras anatómicas mediante la combinación con agentes de contraste [6].

Es posible llevar a cabo modificaciones genéticas o químicas en las cápsides virales para producir PPV capaces de ligar fármacos, metales, péptidos pequeños, o fluoróforos. Las modificaciones se pueden llevar a cabo en cualquiera de las tres superficies que un virus presenta: la interna, la externa o la interface entre subunidades (**Figura 8**)

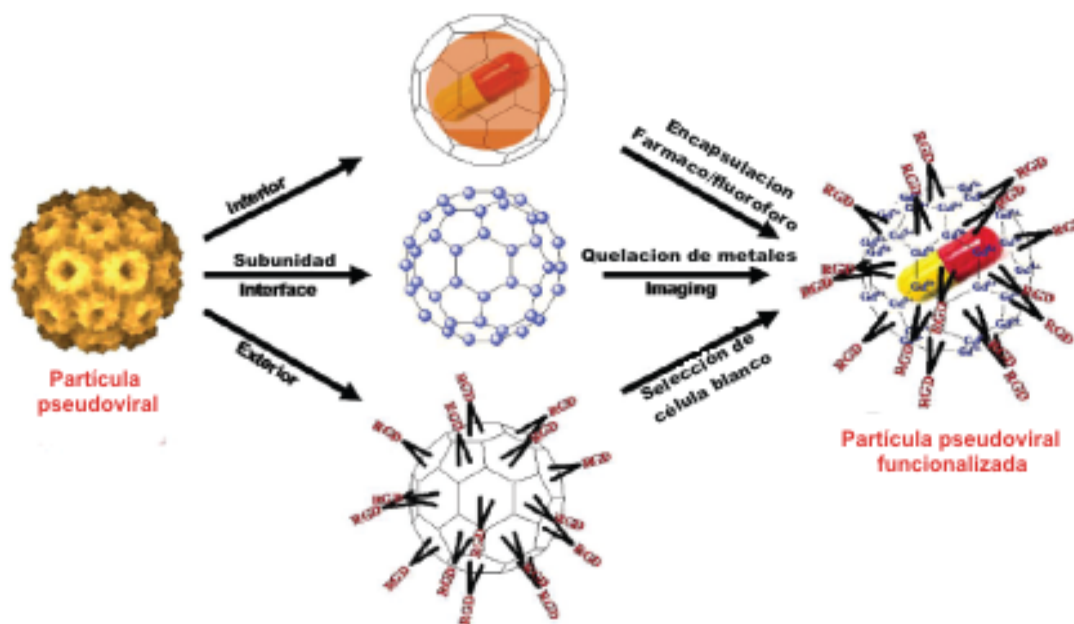


Figura 8.- Representación de las posibles modificaciones de una PPV. Las modificaciones pueden realizarse química o genéticamente.

Los virus más ampliamente estudiados para el desarrollo de estos “transportadores de sustancias” incluyen al virus del mosaico del frijol (Cowpea mosaic virus CPMV), virus del moteado clorótico del frijol (Cowpea chlorotic mosaic virus CCMV), bacteriofago M13, virus del mosaico del tabaco (Tobacco mosaic virus TMV), poliomavirus y parvovirus canino (CPV) [47].

Los trabajos realizados en el CPMV, modelo de estudio para los procesos de bioconjugación, han demostrado que es posible incorporar moléculas como transferrina [48], biotina [49], o ácido fólico en la superficie de la PPV. Esto permite que las PPV ingresen sólo a las líneas celulares que expresan los receptores para las sustancias presentes en la superficie de la partícula. Las partículas pseudovirales de poliomavirus y CCMV han sido empleadas para encapsular sustancias tales como péptidos pequeños [50], polímeros [51] o fármacos [52].

La incorporación de fluoróforos, metales, quantum dots o colorantes en las partículas pseudovirales permite seguir el tráfico sistémico e intracelular de las PPV [8]. Estos sistemas están siendo evaluados para su uso en estudios de “bioimaging”, técnica que consiste en la obtención de imágenes de regiones anatómicas de un organismo de forma no invasiva. Las PPV unidas a un agente de contraste (colorante, fluoróforo, etc.) pueden ser modificadas para reconocer exclusivamente un tipo celular. Esta ventaja se ha aprovechado para lograr la detección temprana de tumores [53].

Algunos ejemplos incluyen:

- Los colorantes Alexa Fluor 555 y Alexa Fluor 488 unidos mediante bioconjugación a la superficie del CPMV son adecuados para observar la vasculatura de embriones de pollo (**Figura 9**), así como la angiogénesis de tumores de la membrana corioalantoidea. [54].
- La bioconjugación de PPV del CPV con Oregon-green 488 para observar su tráfico intracelular en líneas cancerígenas que sobreexpresan el receptor de transferrina [55].

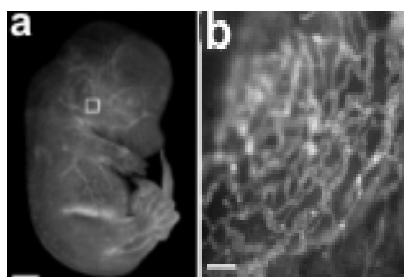


Figura 9.- Generación de imágenes intravitales mediante nanopartículas a) Vasculatura de un embrión de pollo de 11 días perfundido con CMPV-Alexa fluor 555. b) Ampliación de la imagen a) donde se observan los capilares de la cabeza (tomado de [54]).

3.3.1 Estrategias para el desarrollo de sistemas de entrega de sustancias basados en PPV

Las PPV son una alternativa atractiva para el desarrollo de nanomateriales debido a su estructura regular, homogeneidad en tamaño de partícula y facilidad de producción, entre otras características [6]. Dentro de estas características hay tres que han dado lugar a la idea de desarrollar sistemas de entrega a partir de estas macroestructuras proteicas: i) Los cambios conformacionales que sufren algunas PPV permiten el libre intercambio entre el interior de la partícula y la solución que las contiene [56]; ii) otras PPV pueden ser desensambladas y reensambladas *in vitro* [57]; iii) su naturaleza proteica las hace susceptibles a ser modificadas químicamente en sus superficies exterior e interior [49]. Estas tres propiedades permiten emplear diferentes estrategias para llevar a cabo la funcionalización de las PPV.

El pH, la fuerza iónica y la concentración de iones bivalentes inducen cambios conformacionales en la estructura de las PPV. Por ejemplo, varios virus de la familia *Bromoviridae* sufren una expansión radial del 10% cuando el pH del medio que las contiene se eleva por arriba de 7.0 en ausencia de cationes divalentes [56] (**Figura 10**). Esto permite el libre intercambio de sustancias entre el interior de la PPV y el ambiente en la que se encuentra.

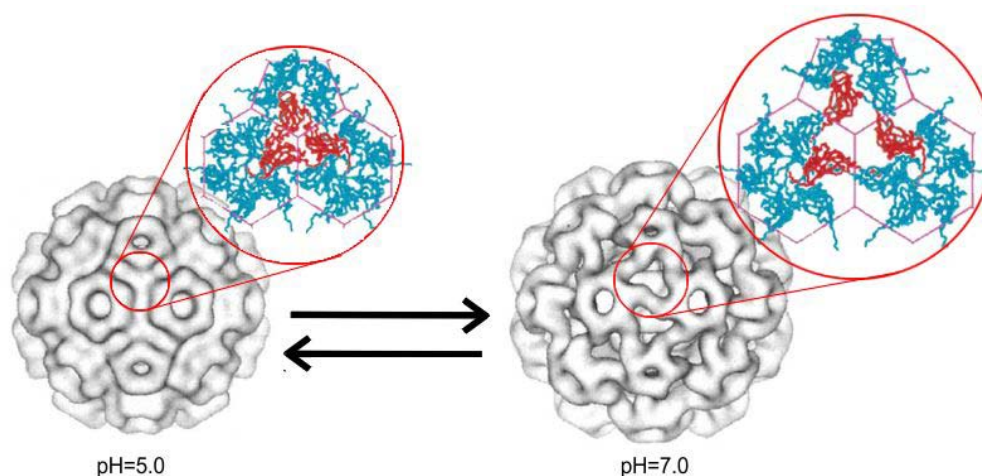


Figura 10.- Expansión radial del CCMV en función del pH. El incremento en el pH desde 5.0 hasta 7.0 promueve un cambio conformacional en las proteínas de la cápside que ocasiona un incremento en el diámetro y la formación de canales que comunican el exterior y el interior de la partícula pseudoviral. El proceso es reversible (adaptado de [56]).

En experimentos con PPV derivadas del virus HCRSV (miembro de la familia *Bromoviridae*) fue posible cargar las partículas con ácido poliacrílico mediante procesos de diálisis. En un primer paso las PPV se incuban en una solución que contiene ácido poliacrílico. El pH y la presencia de EDTA en esta solución favorecen la expansión radial del virus. Después de un periodo de cuatro horas de incubación, esta preparación se dializa contra un buffer de pH bajo (pH=5.0) que contiene cationes divalentes, lo cual permite que la PPV regrese a su tamaño normal. Al final del proceso de diálisis se analizó la preparación y se detectaron PPV cargadas con el ácido poliacrílico [58].

Otra estrategia de funcionalización aprovecha el hecho de que PPV derivadas de rotavirus [57] virus del mosaico del tabaco [59] y poliomavirus [60], entre otros, pueden autoensamblarse *in vitro* bajo ciertas condiciones fisicoquímicas. Aprovechando esta característica, Schmidt et al. [50] fusionaron un dominio WW, capaz de ligar péptidos ricos en prolina, al extremo amino terminal de la proteína VP1 de la cápside de poliomavirus (esta modificación no afecta el ensamblaje de las PPV *in vitro*). Con estas fusiones diseñaron experimentos para cargar las cápside induciendo el ensamblaje de las proteínas virales en presencia de proteína verde fluorescente (GFP), la cual es un ligando para el dominio WW (Figura 11). Se utilizó cromatografía de exclusión en gel para comprobar que las PPV obtenidas contenían GFP. Los resultados mostraron una intensa señal de fluorescencia en el volumen de elución en el que normalmente eluyen las PPV (Figura 12), lo cual indica que las partículas contienen GFP [50].

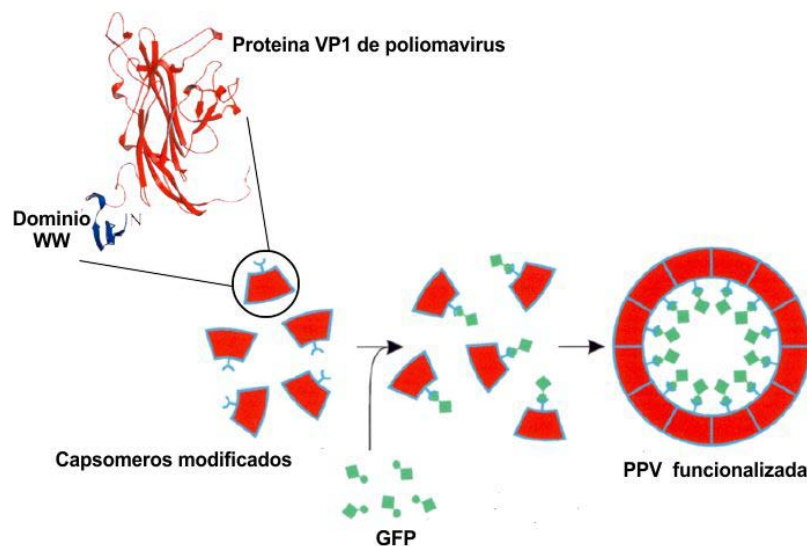


Figura 11.- Esquema de la encapsidación de GFP en PPV de poliomavirus mediante modificación de las proteínas estructurales e inducción del ensamblaje *in vitro* [50].

La reactividad de las cadenas laterales de algunos aminoácidos ha sido aprovechada por algunos grupos de investigación para llevar a cabo modificaciones químicas en enzimas, virus y otras estructuras proteicas [48]. Las dos técnicas de bioconjugación más utilizadas se basan en la reactividad de la cisteína y de la lisina hacia compuestos derivados de la maleimida y la N-hidroxisuccinimida.

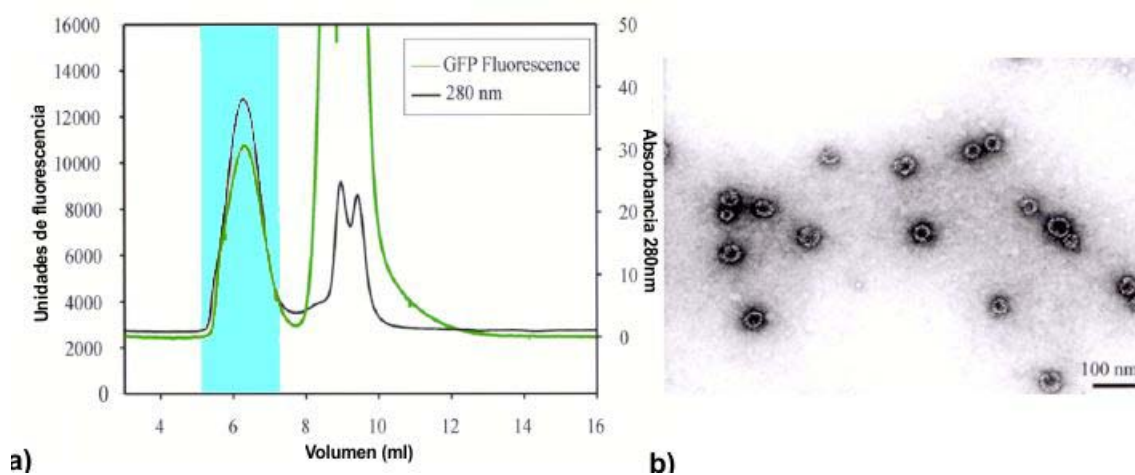


Figura 12.-Análisis de la funcionalización de PPV de poliomavirus a) Perfil cromatográfico de una muestra de proteínas VP1-WW sometida a un proceso de ensamblaje *in vitro* en presencia de GFP. La región sombreada corresponde a las PPV. B) Microscopía electrónica de las PPV recuperadas en el volumen de elución que corresponde a la zona sombreada del cromatograma [50].

Los trabajos de Flenniken et al. [61] y Singh et al. [55] ilustran algunos de los conceptos generales a seguir. En el primer ejemplo se llevó a cabo la incorporación de doxorubicina en la superficie interior de la proteína de choque térmico HspG41C de *Methanococcus jannaschii*. Esta proteína se polimeriza en solución formando nanoestructuras de 12 nm (compuestas por 24 subunidades), las cuales poseen canales de 3 nm de diámetro que permiten el paso de sustancias desde la solución hacia el interior de la estructura. Fleniken introdujo una cisteína a la proteína para proporcionar grupos tioles reactivos en el interior de la nanoestructura. Posteriormente se llevó a cabo la incorporación de la doxorubicina haciendo reaccionar las nanoestructura con un exceso del reactivo doxorubicina-6-maleimidocaproil hidracina (**Figura 13-a**) durante 1 hora a temperatura ambiente. Un análisis de los productos de esta reacción mediante cromatografía de exclusión en gel muestra que la doxorubicina co-eluye con las nanoestructuras (**Figura 13-b**). Los análisis mediante microscopía electrónica y dispersión dinámica de luz mostraron

que la nanoestructura conserva un tamaño de 12 nm después de ser sometida a la reacción de bioconjugación [61].

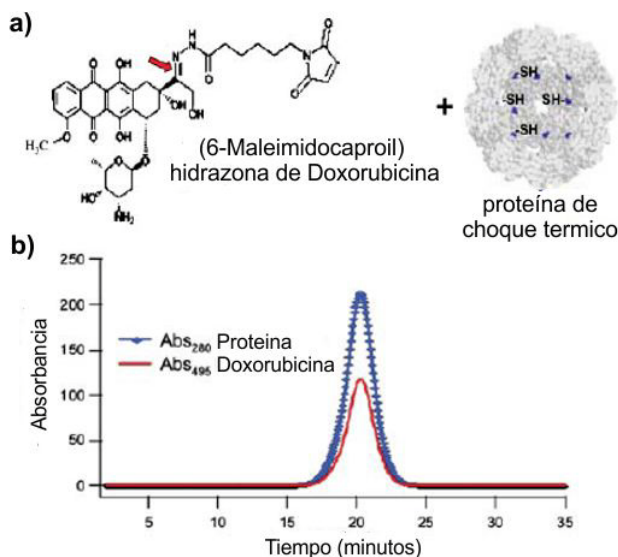


Figura 13.- Funcionalización de proteínas de choque térmico- a) Estructura química de la doxorubicina-6-maleimidocaproil hidrazina. B) Perfil cromatográfico que muestra la co-elución de la doxorubicina y de la nanoestructura formada por la proteína de choque térmico [61].

Singh llevó a cabo la bioconjugación del fluoróforo Oregon-green 488 en la superficie exterior de las PPV derivadas del CPV. Las PPV de CPV están constituidas por 60 copias de la proteína VP2 y cada proteína contiene 20 residuos de lisina. Se identificaron los residuos de lisina accesibles a partir de los datos de distancia radial del residuo, radio efectivo y área superficial accesible al solvente. Una vez que se determinó que existían entre 2 y 6 residuos de lisina susceptibles a ser modificados, las PPV de CPV se hicieron reaccionar con un exceso del ester de hidroxisuccinimida del fluoróforo en una solución al 10% de DMSO. El análisis de las PPV de CPV mostró que entre 45 y 100 residuos de lisina por PPV pueden ser modificados bajo las condiciones experimentales probadas [55].

Tomando en cuenta los ejemplos mencionados se puede observar que para el desarrollo de una estrategia de funcionalización se requiere de información de la PPV con respecto a su estructura cristalina, estabilidad fisicoquímica, aminoácidos que pueden ser sustituidos, sitios susceptibles a modificación química, y posibles cambios conformacionales. Si bien las PPV-VAA ya han sido caracterizadas con respecto a su estructura cristalográfica y los aminoácidos que pueden ser substituidos, el conocimiento relacionado con los cambios conformacionales que sufren las partículas y la estabilidad de las mismas frente a diferentes

condiciones fisicoquímicas es insuficiente. Es necesario generar más información con respecto al comportamiento de las PPV de VAA lo cual permitirá diseñar una estrategia de funcionalización para el desarrollo de un sistema de entrega basado en estas PPV.

3.4 DISPERSIÓN DINÁMICA DE LUZ (DLS)

Entre las técnicas más utilizadas para estudiar PPV está la dispersión de luz. En este trabajo se recurrió al uso de esta técnica para llevar a cabo las determinaciones de tamaño de las PPV bajo las diferentes condiciones fisicoquímicas ensayadas. La técnica permite observar cambios de tamaño producto de la interacción proteína-proteína, el desensamblaje de partículas pseudovirales o la agregación de proteínas en solución.

La dispersión de la luz es un fenómeno óptico que se define como la alteración de la dirección de un haz de luz que incide sobre un objeto, producto de la acción combinada de la refracción, reflexión y difracción (**Figura 14**).

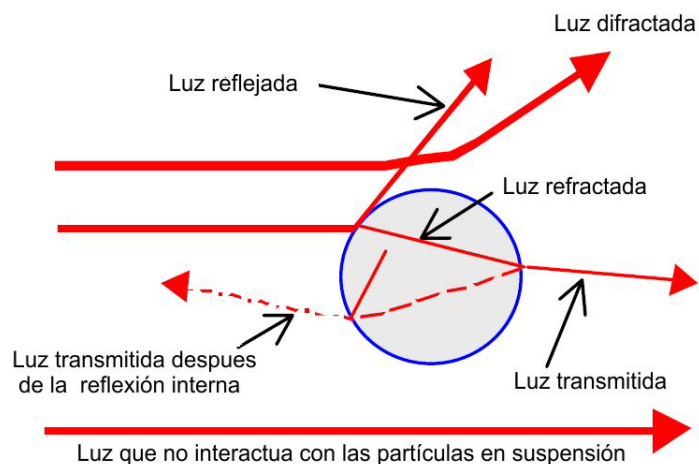


Figura 14.- La interacción de un haz de luz con una partícula en suspensión puede resultar en 4 tipos de interacciones, absorción, difracción, reflexión, refracción.

La intensidad de la luz dispersada I_{ld} en un sistema es función de la intensidad de luz que incide sobre una partícula I_{in} , la longitud de onda λ , el ángulo de medición θ , el diámetro de la partícula D_H y el índice de refracción relativo de la partícula y el medio, n (ecuación 1) [62].

$$I_{ld} = f(I_{in}, \lambda, \theta, D_H, n)$$

Ecuación 1

Cuando una partícula se encuentra suspendida en un medio líquido sufre un movimiento aleatorio en el seno del mismo producto de los choques que sufre constantemente con las moléculas del solvente, este fenómeno recibe el nombre de movimiento Browniano. El movimiento Browniano de las partículas ocasiona cambios en la intensidad de la luz dispersada en el sistema, este cambio depende de la velocidad con la cual las partículas en suspensión se desplazan. La técnica de dispersión dinámica de luz es capaz de medir los cambios en la intensidad de luz dispersada en intervalos de tiempo muy pequeños (micro a nano segundos) y calcular a partir de este cambio la velocidad con la que las partículas se desplazan. Esta velocidad es expresada como un valor de coeficiente de difusión, el cual es utilizado para calcular el diámetro hidrodinámico de las partículas (**Figura 15**).

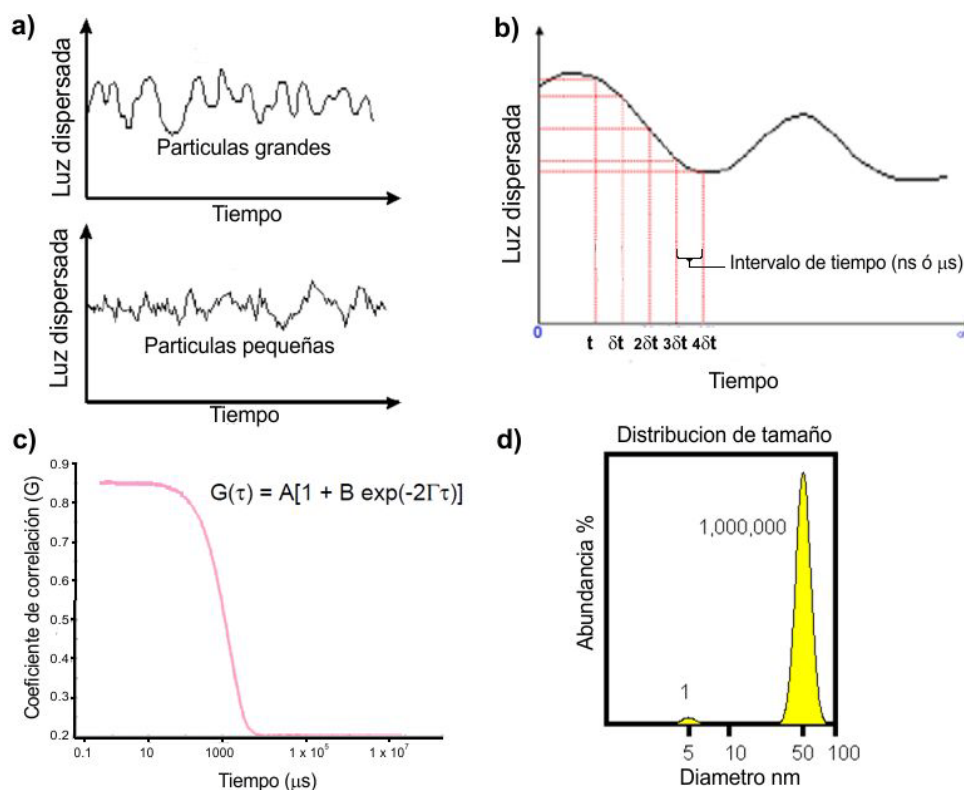


Figura 15.- Determinación del tamaño de partícula mediante DLS. a) El equipo mide la intensidad de luz dispersada a lo largo de un determinado periodo de tiempo. Esta intensidad cambia debido al movimiento Browniano de las partículas y la rapidez a la que este cambio de intensidad se presenta es directamente proporcional a la velocidad de las partículas en suspensión. b) la medición de los cambios de intensidad en intervalos de tiempo muy pequeño permite construir una gráfica conocida como correlograma. c) La pendiente del correlograma recibe el nombre de tiempo de decaimiento (Γ) y es proporcional al coeficiente de difusión. d) Una vez obtenido el valor del coeficiente de difusión es posible construir una distribución de tamaño de partícula para la muestra analizada.

Diferentes teorías, equipos y técnicas han sido desarrollados con el fin de explicar o medir la relación entre la intensidad de la luz dispersada y el tamaño de las partículas en solución. La dispersión dinámica de luz es una técnica que determina el tamaño de una partícula (radio hidrodinámico equivalente D_H) a partir de la medición del coeficiente de difusión de la misma y haciendo uso de la ecuación de Stokes-Einstein (ecuación 2)

$$D_H = \frac{kT}{3\pi\eta d} \quad \text{Ecuación 2}$$

donde: k es la constante de Boltzmann, T la temperatura, η la viscosidad del medio y d el coeficiente de difusión de la partícula

La dispersión dinámica de luz ha sido empleada en diferentes trabajos para determinar la estabilidad de proteínas [63], el ensamblaje *in vitro* de partículas virales [64] y la determinación semi-cuantitativa de la concentración PPV en cultivo [65] entre otras aplicaciones.

3.5 POTENCIAL ZETA (ζ)

Cuando sustancias sólidas son suspendidas en un líquido polar, su superficie adquiere una carga eléctrica producto de fenómenos como la ionización de grupos funcionales o la adsorción de surfactantes o polielectrolitos. La carga eléctrica del sólido en suspensión promueve que los iones de carga eléctrica del signo contrario (contra-iones) presentes en la solución sean atraídos hacia la superficie de la partícula. Un primer grupo de contra iones se concentra alrededor de la partícula formando una capa rígida conocida como capa de Stern. Un segundo grupo de iones que son atraídos con menor intensidad forman una segunda capa menos densa conocida como capa difusa (Figura 16). Estas dos nubes iónicas forman lo que se conoce como la doble capa.

La superficie cargada de la partícula junto con la nube de contra-iones presente en la doble capa generan un potencial eléctrico relativo al seno de la solución. Esta diferencia de potencial tiene un valor máximo en la superficie de la partícula y disminuye al desplazarse hacia el seno del líquido a través de la doble capa. El potencial zeta (ζ) o potencial electrocinético se define como el potencial eléctrico que una partícula posee en la región límite entre la capa de Stern y la capa difusa (Figura 17) y es de gran importancia debido a que se

puede medir fácilmente, a diferencia del potencial eléctrico en la superficie de la partícula o en la capa de Stern.

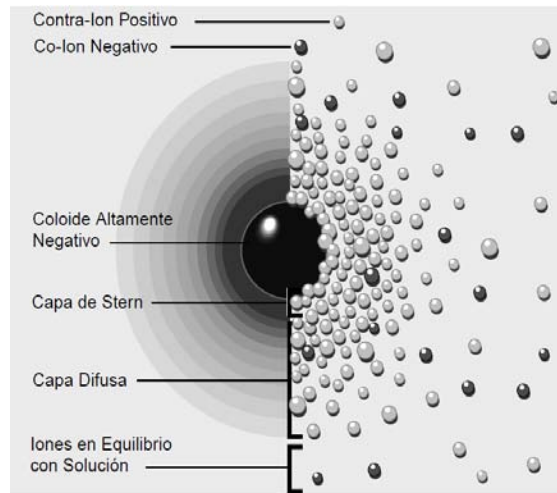


Figura 16.- Distribución de densidad de carga y concentración de iones en los alrededores de una partícula en suspensión.

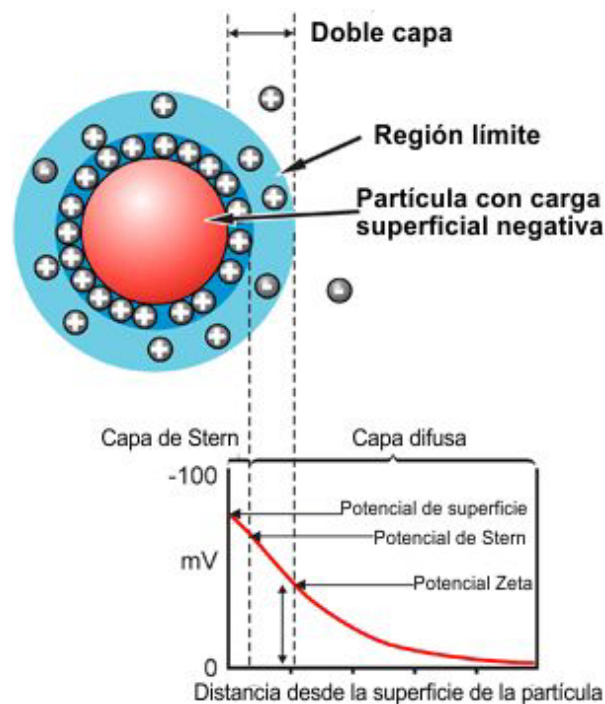


Figura 17.- Esquema de la doble capa de iones que rodea a una partícula en suspensión. Los contra-iones que rodean una partícula presentan diferentes propiedades electroquímicas, dependiendo de si se localizan en la capa de Stern o en la capa difusa. Los primeros al estar fuertemente unidos a la partícula se desplazan junto con esta bajo el efecto del movimiento Browniano, mientras que los contra-iones presentes en la capa difusa permanecen en el seno de la solución cuando la partícula se mueve.

El ζ de una proteína ejerce un efecto notable sobre su estabilidad en solución así como en el rendimiento de diversos procesos durante su purificación [66]. En este trabajo decidimos evaluar el valor de ζ de las PPV-VAA en diferentes condiciones ya que los cambios conformacionales que puede sufrir las proteínas de una PPV durante su desnaturalización, desensamblaje o reacomodo pueden verse reflejados en cambios en el potencial electrostático en su superficie. Además los problemas de agregación de proteínas suelen estar relacionados con el ζ de las mismas y este es el principal problema de estabilidad que se ha reportado para PPV-VAA.

CAPITULO 4

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

4.1 HIPÓTESIS

Las partículas pseudovirales de virus adeno-asociado pueden encapsidar sustancias mediante la manipulación de las condiciones fisicoquímicas.

4.2 OBJETIVO GENERAL

Desarrollar un método para encapsidar sustancias en partículas pseudovirales de virus adeno-asociado con el fin de producir un sistema de entrega a células de mamífero en cultivo

4.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Producir partículas pseudovirales de VAA mediante el sistema CI-BV
- Desarrollar un método de purificación cromatográfico para las partículas pseudovirales de VAA
- Evaluar el comportamiento de las PPV de virus adeno-asociados bajo diversas condiciones de temperatura, pH, fuerza iónica y agentes desnaturalizantes
- Identificar las condiciones o métodos más adecuados para la incorporación de fluoresceína en la superficie y/o interior de las PPV de virus adeno-asociados

CAPITULO 5

MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 LÍNEAS CELULARES, RESGUARDOS VIRALES, MEDIO DE CULTIVO Y CONDICIONES DE CULTIVO.

Se utilizaron células de insecto Sf9 para el aislamiento, amplificación y determinación del título de los resguardos virales y para las cinéticas de producción de baculovirus. Las cinéticas de producción de PPV-VAA se hicieron con células Sf9 y High Five™. Ambas líneas celulares se cultivaron en medio SF900-II (GIBCO, USA) a 27°C, excepto para el aislamiento de placas virales. El mantenimiento de rutina de las células se hizo en matraces Erlenmeyer de 250 ml con un volumen de trabajo de 40 ml y una agitación de 110 rpm, subcultivando las células cada 72 horas con inóculos de $5-7 \times 10^5$ células/ml. La concentración celular se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer y la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión de azul de tripano. Para todos los experimentos se utilizó el nucleopolihedrovirus de *Autographa californica* bac Cap, donado por el Dr. Robert Kotin (NIH, USA). El baculovirus contiene el gen *cap* de VAA-2 que codifica para VP1, VP2, y VP3 bajo el promotor *polh*.

5.2 AISLAMIENTO DE PLACAS VIRALES

Se empleó el método descrito por O'Reilly [67]. Se sembraron células Sf9 (viabilidad mayor al 95%) en cajas de 6 pozos a una concentración de 1.5×10^6 células/ pozo en un volumen de 2 ml de medio de Grace (GIBCO, USA) sin suero fetal bovino (SFB). Las cajas se incubaron durante 1 hora a 27°C sin agitación para permitir la adhesión de las células. Se prepararon diluciones seriadas (10^{-2} a 10^{-6}) de los resguardos virales del baculovirus bac Cap en medio de Grace sin SFB. Se retiró el medio de cultivo de las placas y a cada pozo se adicionaron 800 µl de las diluciones virales y a un pozo 800 µl de medio como control negativo. Las cajas se incubaron a 27°C por 4 horas con agitación moderada. Al término del periodo de incubación se removió el líquido de cada pozo y se añadieron 2

ml de medio de plaqueo (6 ml de medio de Grace 2X, 3 ml de una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 4%, 1.2 ml de SFB, 1.8 ml de agua destilada estéril) a una temperatura de 37°C. Se dejó solidificar el medio y se incubaron las cajas a 27°C sin agitación en un ambiente húmedo durante 120 horas. Al término de este periodo de incubación se adicionaron 2 ml por pozo de la solución de tñido (6 ml de medio de Grace 2X, 150 µl de una solución de rojo neutro 5 mg/ml, 6 ml de una solución de agarosa al 1.5%). Se dejó solidificar la agarosa y se incubaron las cajas a 27°C durante toda la noche. Se identificaron las placas virales por la formación de halos incoloros contra un fondo rojo. Dichos halos indican que las células de esa zona están muertas, presumiblemente a causa de la infección por el baculovirus, por lo que son incapaces de retener el colorante. Las placas se colectaron retirándolas de la caja mediante succión usando una punta de 200 µl estéril. Los botones de agarosa se resuspendieron en 500 µl de medio de Grace con 0.5% de SFB.

Las placas virales seleccionadas se sometieron a un primer ciclo de amplificación, con la finalidad de incrementar el número de baculovirus e identificar cuál de las placas aisladas produce una mayor cantidad de proteína recombinante. Se sembraron células Sf9 (viabilidad mayor al 95%) en cajas de 6 pozos a una concentración de 1×10^6 células/ pozo en un volumen de 2 ml de medio SF900-II, las cajas se incubaron durante 1 hora a 27°C. Se eliminó el medio de cultivo de cada pozo y se infectó con un 1 ml de una dilución 1:10 (en medio Sf900-II) de una placa viral seleccionada, se incubó 1 hora a 27°C con agitación, moderada. Sin retirar el líquido, se adicionó 1ml de medio Sf900-II a cada pozo y se incubó a 27°C durante 120 horas. Después de la incubación se colectó el líquido y se centrifugó a 1000 rpm, se separaron el sobrenadante y las células. El sobrenadante se utilizó para la posterior amplificación del resguardo viral mientras que las células se lisaron y fueron utilizadas para evaluar la expresión de proteína recombinante mediante Western blot.

5.3 AMPLIFICACIÓN DE RESGUARDOS VIRALES

40 ml de un cultivo de células Sf9 en medio SF-900-II a una concentración de 7.5×10^5 células/ml fueron infectados con 400 µl del sobrenadante recuperado de la primera ronda de amplificación de la placa viral identificada como la mejor productora de proteína recombinante. El cultivo se incubó a 27°C y una agitación de 110 rpm durante 120 horas para posteriormente colectar el sobrenadante (centrifugación a 650 g por 10 minutos) y almacenarlo a 4°C tras la adición de 0.5% SFB.

5.4 DETERMINACIÓN DE TÍTULOS VIRALES

Se llevó a cabo mediante el método propuesto por Mena y colaboradores [68]. El método consiste en medir la viabilidad celular en función de la concentración de virus a las que las células han sido expuestas. Un ajuste matemático de ambas variables permite calcular la concentración de virus que mata al 50% de las células, valor que se relaciona con la cantidad de partículas infecciosas de virus presente en una muestra problema. En cajas de 96 pozos (2 cajas por muestra a titular) se sembraron 5×10^3 células/pozo en 50 μ l de medio SF900-II. Se prepararon diluciones seriadas (10^0 a 10^{-10}) del resguardo viral a titular, y se agregaron 10 μ l/por pozo usando 16 pozos por dilución y 16 pozos como control negativo a los que se les adicionó medio. Las cajas se incubaron a 27°C en un ambiente húmedo durante 6 días. Al término del periodo de incubación, se agregaron 10 μ l/pozo de una solución (5 mg/ml) de bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tatrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St, Louis, MO, USA). Las cajas se incubaron durante dos horas a temperatura ambiente bajo agitación moderada, se centrifugaron por 10 minutos a 2000 g y se descartó el sobrenadante. Los cristales de formazan formados, producto de la actividad de la deshidrogenasa mitocondrial sobre el MTT, fueron solubilizados usando 50 μ l/pozo de dimetil sulfoxido (DMSO). Se midió la absorbancia a 570 nm usando un lector de microplacas (modelo 550; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; USA). Los datos de absorbancia y dilución viral se ajustaron en un modelo logístico (ecuación 3), usando el programa Sigmaplot 11.0.

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{D}{D_0}\right)^b} \quad \text{Ecuación 3}$$

En la ecuación 3 **Y** representa la absorbancia, **D**, la dilución del resguardo viral, **Y₀**, la absorbancia mínima (que corresponde a la viabilidad mínima detectada), **a** es la absorbancia máxima, **b** es la pendiente de la curva y **D₀** es la dilución a la cual la respuesta fue del 50%. Introduciendo el valor de **D₀** en la ecuación 4, se calculó la dosis letal media del resguardo viral (**TCLD₅₀/ml**).

$$TCLD_{50}/ml = \frac{1}{D_0V} \quad \text{Ecuación 4}$$

En la ecuación 4, **V** es el volumen de dilución viral añadido a cada pozo. La relación entre $TCLD_{50}/ml$ y la dosis infecciosa media ($TCID_{50}/ml$) fue determinada por Mena y colaboradores y está dada por la ecuación 5.

$$\log(TCID_{50}/ml) = 0.912 \cdot \log(TCLD_{50}) + 1.674 \quad \text{Ecuación 5}$$

El valor de $TCID_{50}/ml$ obtenido a partir de la ecuación 5 se utiliza para calcular el título viral de la muestra en unidades formadoras de placa (ufp/ml), mediante la ecuación 6.

$$pfu/ml = TCID_{50}/ml \times 0.69 \quad \text{Ecuación 6}$$

5.5 PRODUCCIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES Y PPV-VAA POR DOS LÍNEAS CELULARES

En matraces Erlenmeyer de 250 ml se prepararon por triplicado cultivos de células Sf9 y High FiveTM en medio Sf900-II a una CCI de 8×10^5 cél/ml y un volumen de trabajo de 60 ml. Ambos cultivos se infectaron con el baculovirus recombinante bac Cap a una MDI de 0.1 ufp/célula. Los cultivos se incubaron a 27°C a una agitación de 110 rpm durante 120 horas. Cada 24 horas se tomó 1 ml de muestra, se determinó la concentración celular y viabilidad. Las muestras fueron centrifugadas a 650 g por 10 minutos, se decantó el sobrenadante y el pellet fue sometido al proceso de extracción propuesto por Chahal y colaboradores [69]. Brevemente, se resuspendieron las células en buffer de lisis (50 mM Tris base, 2 mM MgCl₂, 1X inhibidor de proteasas (SIGMA), 50 U/ml de benzonasa, pH 7.5), se incubaron durante 30 minutos, se adicionó MgCl₂ hasta alcanzar una concentración de 39.5 mM. Se llevaron a cabo tres ciclos de congelado-descongelado y se centrifugó a 650 g durante 15 minutos para recolectar el sobrenadante y filtrar el mismo a través de una membrana de 0.22 µm. La misma metodología se utilizó para la producción y recuperación de rutina de PPV-VAA.

5.6 PURIFICACIÓN DE PPV DE VAA

5.6.1 Selección de pH para cromatografía de intercambio aniónico.

Se prepararon soluciones amortiguadoras de Tris 50 mM a diferentes valores de pH (entre 6.0 y 8.5 con incrementos de 0.5 unidades). Para cada pH se prepararon soluciones con diferente concentración de NaCl (0 mM, 150 mM, 500 mM, 1M). Se colocaron

alícuotas de 1 ml de resina en tubos cónicos de 15 ml, y se procedió a equilibrar la resina. Para esto, se adicionó a los tubos alícuotas de 5 ml de solución amortiguadora Tris 50 mM-NaCl 500 mM con pH correspondiente, se incubó durante 5 minutos en agitador orbital, 3 minutos en reposo y posteriormente se centrifugó a 10 g durante 20 segundos a 25°C y el sobrenadante se retiró mediante decantación. Los lavados se hicieron 4 veces con solución Tris 50 mM-NaCl 500 mM y 5 veces con solución Tris 50 mM-NaCl.

Alícuotas de 2 ml de extracto celular (3.4 mg de proteína total) se diluyeron 1:5 con soluciones amortiguadoras de Tris 50 mM a diferentes pH. Las diluciones se colocaron en cada uno de los tubos cónicos con resina previamente equilibrada y se incubaron durante 20 minutos en un agitador orbital. Se dejaron 3 minutos en reposo para posteriormente centrifugar a 10 g durante 20 segundos. Los sobrenadantes de cada tubo se retiraron y almacenaron para su posterior análisis. La resina en cada tubo se lavó con alícuotas de 2 ml de solución amortiguadora Tris 50 mM del pH correspondiente, se incubó durante 10 minutos en agitador orbital, 3 minutos en reposo y posteriormente se centrifugaron los tubos a 8 g durante 20 segundos. Los sobrenadantes de cada tubo se retiraron y almacenaron para su posterior análisis. Se procedió a eluir la proteína adsorbida a la resina mediante la adición secuencial de alícuotas de 2 ml de soluciones amortiguadoras: 150 mM, 500 mM y 1000 mM de NaCl. En cada paso de elución, se incubaron los tubos durante 10 minutos en un agitador orbital, 3 minutos en reposo y se centrifugaron a 10 g durante 20 segundos. Los sobrenadantes de cada tubo y etapa se retiraron y almacenaron para su posterior análisis.

5.6.2 Cromatografía de intercambio aniónico

Se utilizaron 25 ml de resina de Q Sepharose fast flow (General Electric Healthcare-Amersham Bioscience) empacada en una columna XK 16/20 (General Electric Healthcare) a un flujo de 3 ml/min. El buffer A está compuesto de Tris 50 mM pH 6.5; el buffer B está compuesto por Tris 50 mM y NaCl 1 M pH 6.5. El equipo empleado fue un ÄKTA PRIME (GE Healthcare, USA) operado a 1.5ml/min y equipado con un detector de UV a una longitud de onda de 280nm. La columna se equilibró con 4 volúmenes de columna de buffer A, se inyectó la muestra (obtenida como se describió en producción de proteínas recombinantes y PPV-VAA) y la columna se lavó con 4 volúmenes de columna de buffer

A. Posteriormente se hizo un gradiente de 0% a 50% de Buffer B (0 a 500mM de NaCl) en 5 volúmenes de columnas y se lavó con 2 volumen de columna (50%A, 50%B), antes de hacer un cambio escalonado de fase móvil hasta 100% de Buffer B.

5.6.3 Centrifugación isopícnica en iodixanol o CsCl

Se tomaron alícuotas de 4.5 ml de la fracción positiva a VAA obtenida por cromatografía de intercambio iónico y se le agregó CsCl hasta alcanzar una concentración de 0.39 g/ml ($\rho=1.30 \text{ g/cm}^3$). La solución se transfirió a tubos Ultra Clear™ de 13 x 51 mm (Beckman Coulter), los que se centrifugaron a 35,000 rpm (122,000 g) en un rotor SW50.1 (Beckman, U.K.) durante 18 horas a 4°C. Se colectaron las bandas y se determinó su densidad mediante medición del índice de refracción.

Los gradientes en iodixanol se hicieron como fue descrito por Zolotukhin y colaboradores [70] salvo algunas modificaciones. Alícuotas de un mililitro de la fracción positiva a VAA obtenida por cromatografía de intercambio iónico se depositaron en el fondo de tubos Ultra Clear™ de 13 x 51mm. Acto seguido se depositaron por debajo de la muestra y en orden las siguientes soluciones: 1.1 ml de iodixanol (OptiPrep, Axis-Shield) al 15% en PBS-1M NaCl-1 mM MgCl₂ y 2.5 mM KCl, 800µl de iodixanol al 25% en PBS-1 mM MgCl₂ y 2.5 mM KCl (PBS-MK), 800 µl de iodixanol al 40% en PBS-MK, 800 µl de iodixanol al 50% en PBS-MK y 800 µl de iodixanol al 60%. Los tubos se centrifugaron a 48,000 rpm (218,400 g) en un rotor SW55 (Beckman, U.K.) durante 120 minutos a 18°C. Se colectaron las bandas, se determinó su densidad mediante medición del índice de refracción e interpolación en la tabla correspondiente.

5.7 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA TOTAL

Se utilizó el método estándar de Bradford para placas de 96 pozos de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Bio-Rad). Se preparó una curva estándar a partir de una solución de albúmina bovina (1 mg/ml), haciendo diluciones en un rango de 50 a 500 µg/ml. Se prepararon diluciones apropiadas para las muestras a analizar. Se colocaron por triplicado 10 µl de las diluciones del estándar o muestra en cajas de 96 pozos y se adicionó 200 µl de reactivo de Bradford (Bio-Rad). Las muestras se incubaron durante 5 minutos y

se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas. La concentración de las muestras se calculó mediante interpolación en la curva estándar.

5.8 ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE Y WESTERN BLOT

En los casos en los que fue necesario incrementar la concentración de proteína se concentraron las muestras mediante centrifugación al vacío en un sistema Speed Vac Plus SC110 A (Thermo Savant, USA) a temperatura ambiente.

Para el ensayo de producción de cápsides por las dos líneas celulares, volúmenes iguales de sobrenadantes y extractos celulares se diluyeron 1:4 en buffer de carga (1 ml Tris 0.5 mM pH 6.8, 1.6 ml de SDS al 10%, 200 μ l de azul de bromofenol al 0.2%, 800 μ l de glicerol y 400 μ l β -mercaptoetanol) y se hirvieron por 10 minutos. Se cargaron 30 μ l de muestra por pozo y se corrieron en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 12% con un gel concentrador al 4%. Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore, USA) en sistema semiseco (Owl scientific) a 400 mA durante una hora usando buffer de glicina (192 mM glicina, 25 mM Tris, 20% metanol). Después, las membranas se incubaron una hora en solución de bloqueo (PBS-Tween 20 al 0.1%, con leche descremada al 5%). Se llevaron a cabo 3 lavados de 7 minutos con buffer PBS-Tween 20 al 0.1% (PBST). Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo primario preparado en PBST. Para la detección de las tres proteínas de cápside del VAA se empleó el anticuerpo monoclonal B1 (cat. 61058 Progen) a una dilución 1:1,000, para la detección de baculovirus se utilizó anti AcNPV gp64 de baculovirus (Fast Plax cat. 70814 Novagen) a una dilución 1:10,000. Se lavaron las membranas 3 veces durante 7 minutos. Se incubó por una hora 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 describió para finalmente revelar con carbazol (4.9 mL de carbazol a 8 mg/mL, 12 mL de buffer de acetatos 0.05 M pH 5, 30 μ L de ácido de hidrógeno al 30%). Para el resto de los experimentos, las muestras para electroforesis-Western blot se prepararon como se describió pero procurando cargar 5 μ g de proteína por pozo.

5.9 DOT-BLOT

La presencia de PPV de VAA intactas en diferentes muestras, fue determinada mediante ensayos de Dot-blot usando un anticuerpo monoclonal específico para epítopes conformacionales presentes en las PPV completas (A20 Progen Biotechnik N° Cat. 61055). Brevemente; un volumen adecuado de la muestra a analizar fue diluido hasta 500 µl con PBS y filtrada a través de un filtro de 0.22 µm. Las muestras fueron pipeteadas sobre una membrana de nitrocelulosa (Hybond C extra, Amersham Biosciences) montada en un equipo Bio-Dot SF (Biorad, USA) conectado a una bomba de vacío. Se aplicó vacío hasta que las muestras fueron completamente filtradas a través de la membrana. Las membranas se incubaron una hora en solución de bloqueo y posteriormente fueron lavadas con buffer PBST. Las membranas se incubaron toda la noche a 4°C con el anticuerpo A20 preparado en PBST a una dilución 1:1000, al final de la incubación se hicieron tres lavados con PBST y se incubó durante una hora con anticuerpo anti Ig-G de ratón acoplado a peroxidasa. Las membranas fueron reveladas usando la solución de carbazol antes descrita.

5.10 ELECTROFORESIS EN CONDICIONES NATIVAS

Se desarrolló un método de inmunodetección de PPV de VAA mediante electroforesis en condiciones nativas utilizando el sistema vertical Mini-PROTEAN II (Biorad Laboratories). Se prepararon geles verticales (7 cm x 8.3 cm x 1.5 mm) de agarosa (Ultrapure™ Agarose, Invitrogen) al 0.8 y 1.6% en buffer Tris 400mM pH 8.8. Las muestras (24 µl) se mezclaron 3:1 con buffer de carga 4X (Tris 250 mM, glicerina 40%, azul de bromofenol 0.01% y SDS a diferentes concentraciones) antes de cargarse en el gel. La electroforesis se llevó a cabo en buffer de Laemmli (Tris 25mM, Glicina 192mM, SDS 0.1% pH 8.3) a voltaje constante (100 V) a 4°C hasta que el frente de corrida alcanzó la parte inferior del gel. Después de la electroforesis, las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF en un sistema húmedo (Mini Trans-Blot cell, Biorad Laboratories) a voltaje constante (35V) durante 16 horas a 4°C, usando un buffer de Tris 25 mM, glicina 192mM). La detección de PPV VAA en las membranas se hizo de forma similar a la descrita en la sección anterior.

5.11 CUANTIFICACIÓN DE PPV DE VAA

Se empleó un kit comercial distribuido por PROGEN Biotechnik (N° catalogo PRAVT). El ensayo está basado en la técnica de ELISA y utiliza el anticuerpo monoclonal A20, que reconoce epitopes conformacionales formados por las proteínas VP ensambladas. Se construyó una curva estándar (**Figura 18**), empleando un patrón con una concentración conocida de cápsides. Las muestras se diluyeron 1:2500 y 1:5000 antes de ser analizadas. Una vez medida la absorbancia de las muestras, la concentración de cápsides se calculó mediante interpolación en la curva estándar.

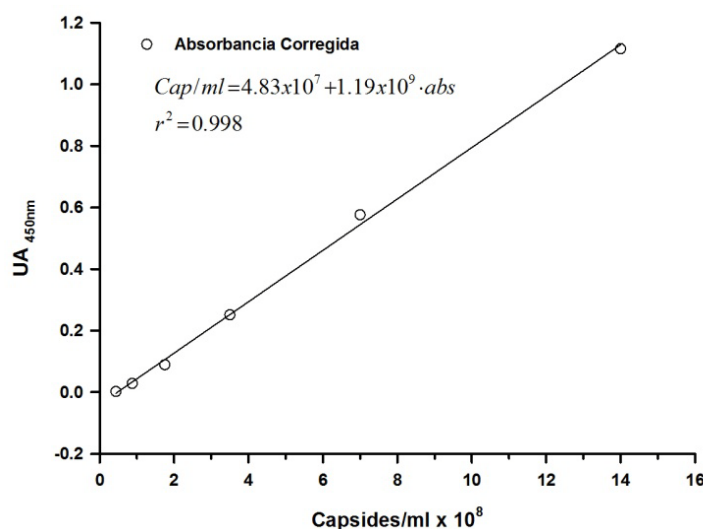


Figura 18.- Curva estándar para la cuantificación de PPV de VAA mediante ELISA

5.12 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

La integridad de las PPV obtenidas fue evaluada mediante microscopía electrónica de transmisión. Alícuotas de 10 μ l se depositaron en la superficie de una rejilla de cobre (número de malla 200) cubierta con formvar y carbón. Las muestras se dejaron fijar durante 5 minutos, el exceso de muestra se retiró y se adicionaron 10 μ l de una solución de acetato de uranilo al 1% para teñir la muestra negativamente. El tiempo de tinción fue de 3 minutos. Las muestras fueron observadas con un microscopio electrónico marca JoelJM1011 ó Zeiss EM900 ambos operados a 80 kV.

5.13 SONICACIÓN

Las muestras fueron sometidas a vibraciones ultrasónicas en el equipo Misonix S-4000 (Q-Sonix). Brevemente: alícuotas de 50 μl se colocaron en tubos eppendorf de 600 μl , los cuales fueron sumergidos en el baño de agua (4°C) del equipo. El equipo se operó a una amplitud de 2, durante intervalos de actividad de tres segundos de duración seguidos cada uno por un intervalo de reposo de 5 segundos. Al conjunto de 3 intervalos de actividad y tres de reposo se le denominó ciclo de sonicación. Las muestras fueron tratadas con 1,2, 3 ó 4 ciclos de sonicación y analizadas mediante dispersión dinámica de luz

5.14 MEDICIONES DE TAMAÑO DE PARTÍCULA

Para las determinaciones de tamaño de partícula se empleó un equipo de dispersión dinámica de luz Zetasizer nano-ZS (Malver Instruments Ltd, U.K.) equipado con un láser de 633nm de longitud de onda. Las mediciones se llevaron a cabo a 25°C y un tiempo de equilibrio de cinco minutos (salvo que se especifique lo contrario). La posición de lectura de la celda y nivel de atenuación (0-100%) a usar fueron ajustadas automáticamente por el software de control del equipo (Zetasizer software 6.01). El equipo fue utilizado en dos modalidades, batch y en línea acoplado a un HPLC.

- a) Mediciones en modalidad batch: Las mediciones se hicieron en una celda de cuarzo con un paso óptico de 3 mm (N° de Cat. ZEN2112, Malver Instruments Ltd, U.K)
- b) Mediciones en línea: El equipo Zetasizer nano-ZS se conectó a un sistema cromatográfico Waters equipado con una columna Ultrahydrogel 500 (7.8mm x 30mm y tamaño de poro de 50nm), un detector de fluorescencia Waters 2475 ($\lambda_{\text{ex}}=275\text{nm}$ $\lambda_{\text{em}}=304\text{nm}$) y un detector de absorbancia de doble longitud de onda Waters 2487 (260 nm y 280 nm) o un detector de arreglo de diodos Waters 996. Las corridas cromatográficas se hicieron operando el equipo a una temperatura de 37°C y un flujo de 0.9 ml/min con buffer 30 mM de Tris a pH 8.0. La conexión entre ambos equipos se hizo mediante una celda de flujo (N° de Cat. ZEN0023) conectada a la línea de salida del detector de fluorescencia del sistema de HPLC.

5.15 DETERMINACIÓN DE POTENCIAL ZETA (ζ)

Los perfiles de ζ a diferentes temperaturas fueron determinados indirectamente a través de la medición de la movilidad electroforética (equipo Zetasizer nano-series) y el uso de la aproximación de Samoluchowski para la resolución de la ecuación de Henry mediante el software Zetasizer v.6.2. Las mediciones se hicieron en celdas capilares de poliestireno con electrodos de oro (N° Cat DTS 1060, Malvern Instruments). La posición de lectura de la celda y nivel de atenuación fueron seleccionadas automáticamente por el software del equipo, mientras que el voltaje seleccionado fue de 50 V para todas las mediciones.

5.16 FLUORESCENCIA

Se utilizó un espectrofluorímetro LS-55 (Perkin Elmer Inc). Se obtuvo el espectro de emisión de las PPV de VAA en el rango de 280 a 500nm, excitando las mismas a 280nm. Las aperturas de los monocromadores de excitación y emisión se fijaron en 6.0nm y 8.0nm respectivamente para todos los ensayos. Las lecturas se llevaron a cabo en una celda de cuarzo con un volumen de 50 μ l y un paso óptico de 3 mm.

Se calculó el centro de masa espectral de cada uno de los espectros de fluorescencia obtenidos mediante la ecuación 7 [71].

$$\text{Centro de masa (nm)} = \frac{\sum_{i=280}^{500} (\lambda_i \cdot \mathbf{URF}_i)}{\sum_{i=280}^{500} \lambda_i} \quad \text{Ecuación 7}$$

Donde λ_i y \mathbf{URF}_i representan la longitud de onda y unidades relativas de fluorescencia para cada punto del espectro respectivamente

CAPITULO 6

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

El trabajo realizado con la finalidad de lograr el desarrollo de un sistema de entrega de sustancias a células mediante la funcionalización de partículas pseudovirales de virus adeno-asociado se dividió en 4 etapas. En primera instancia se procedió a determinar las condiciones de cultivo e infección de células de insecto que permitieron obtener grandes cantidades de baculovirus recombinantes y PPV-VAA. Se investigó el efecto de la multiplicidad de infección y la concentración celular al momento de la infección sobre la producción del baculovirus recombinante bac Cap. Se investigó la capacidad de producción de PPV-VAA de dos líneas celulares de insecto así como la distribución de las PPV entre el sobrenadante y la fracción celular de los cultivos.

En la segunda etapa se trabajó sobre el desarrollo de un método de purificación de PPV-VAA mediante una combinación de técnicas cromatográficas y de centrifugación, con la finalidad de obtener material suficiente para la tercera y cuarta etapa de este trabajo. En la tercera etapa se procedió a llevar a cabo una caracterización de las PPV-VAA frente a diferentes factores fisicoquímicos que nos permitieran proponer una estrategia para lograr la incorporación de una molécula fluorescente al interior de las PPV-VAA. Y finalmente en la cuarta etapa se realizaron los experimentos encaminados a lograr la funcionalización antes descrita de las PPV-VAA.

A lo largo de este proyecto se recurrió a diferentes pruebas estadísticas con la finalidad de determinar; 1) diferencias entre los tratamientos propuestos para la producción de baculovirus o partículas pseudovirales (ANOVA); y 2) relaciones entre las diferentes variables medidas durante la caracterización de las PPV (prueba producto momento de Pearson). Para cada una de las pruebas estadísticas aplicadas se calcularon el valor-p y la potencia de la prueba estadística. El valor-p de una prueba estadística representa la

probabilidad de obtener los resultados observados a causa del azar, es decir que la hipótesis nula sea verdadera. Para cada prueba estadística, el valor-p calculado se comparó contra un nivel de significancia (α) establecido *a priori* (para este trabajo $\alpha=0.05$), si el valor-p fue menor al valor de significancia, se consideró como falsa la hipótesis nula. Por otro lado, la potencia de una prueba estadística representa la probabilidad (expresada en porcentaje) de detectar diferencias entre tratamientos o relaciones entre variables cuando éstas realmente existen. Por convención se considera que una prueba estadística es robusta cuando el valor de potencia de la misma es superior al 80%, caso contrario se requiere incrementar el número de replicas o disminuir la varianza de las mediciones para obtener una conclusión confiable del análisis estadístico.

6.2 AMPLIFICACIÓN DE RESGUARDOS VIRALES

Con la finalidad de obtener resguardos virales con títulos virales altos se diseñó un experimento en el que se evaluó el efecto de dos variables sobre la producción del baculovirus recombinante bac Cap. Los resultados de este trabajo fueron publicados en el artículo: “*Efecto de la densidad celular y la multiplicidad de infección sobre la producción de baculovirus recombinantes en cultivos de células de insecto*” y nos permitieron generar resguardos virales para la producción de las PPV-VAA. Este artículo se incluye en el **anexo F**.

6.3 EVALUACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE PPV-VAA EN DOS LÍNEAS CELULARES

Los niveles de producción de proteína recombinante alcanzados en el sistema células de insecto dependen de la línea celular empleada. Según la literatura, la productividad de la línea High Five™ es en muchos casos mayor que la de otras líneas celulares de insecto [72,73]. Sin embargo, la diferencia depende de la proteína recombinante en cuestión [16]. Debido a que se requieren grandes cantidades para la caracterización fisicoquímica de proteínas, decidimos comparar la capacidad de producción de PPV-VAA entre las líneas

celulares de insecto más utilizadas para la producción de proteínas recombinantes (High Five™ y Sf9).

Se prepararon por triplicado cultivos de ambas líneas celulares a una concentración inicial de 0.8×10^6 cél/ml y un volumen de trabajo de 60 ml. Los cultivos fueron infectados a una multiplicidad de infección (MDI) de 0.1 ufp/cél. Este valor se escogió con base en el trabajo de Gallo [20], quien evaluó el efecto de diferentes MDI sobre la producción de proteína VP de VAA, obteniendo una mayor productividad al usar 0.1 ufp/cél. Se tomaron muestras de 1 ml a tiempo 0 y cada 24 horas hasta las 120 horas post infección (hpi), momento en el cual se cosecharon los cultivos. Para cada muestra se llevaron a cabo determinaciones de concentración celular y viabilidad y posteriormente se procesaron como se describe en materiales y métodos para obtener el extracto celular y el sobrenadante. A cada uno se les determinó el contenido de proteína total (mediante el método de Bradford) y el contenido relativo de proteína recombinante de VAA (mediante Western blot).

6.3.1 Cinéticas de crecimiento

En la **figura 19-a** se muestran las cinéticas de crecimiento de las dos líneas celulares infectadas con el baculovirus bac Cap. Ambas presentaron sólo un ligero incremento en la concentración celular, siendo mayor el observado para las células Sf9, que duplicaron su concentración a las 72 hpi, mientras que las células High Five™ incrementaron su concentración solo en un 50%. En ambos casos el incremento en la concentración celular fue mucho menor al que exhibieron los cultivos sin infectar (no se muestran los datos), en los que las concentraciones máximas alcanzaron 1.2×10^7 cél/ml y 7×10^6 cél/ml para Sf9 y High Five™, respectivamente. El cese del crecimiento de las células de insecto, producto de la infección con el baculovirus, obedece al secuestro que este último hace de la maquinaria molecular de la célula con la finalidad de replicarse [14,67]. Este fenómeno se observa en los cultivos de células de insecto infectadas sin importar la línea celular cultivada o el baculovirus recombinante utilizado para la infección [74-76].

En la **figura 19-b** se muestra la disminución de la viabilidad celular a lo largo del tiempo de cultivo. A las 48 hpi, se observó un descenso brusco en la viabilidad de los cultivos. Este cambio brusco en la viabilidad puede ser producto de la acción combinada de la probable toxicidad de la proteína recombinante y la capacidad lítica del baculovirus. Las

células Sf9 presentaron viabilidades entre 5 y 15% inferiores a las exhibidas por las células High Five™ durante la mayor parte del cultivo. Este comportamiento puede deberse a diferencias de sensibilidad entre las dos líneas celulares frente a los efectos líticos del baculovirus y los efectos tóxicos de la proteína recombinante. La letalidad de la infección con el baculovirus bac Cap fue diferente a la observada para otros baculovirus cuando se utiliza la misma multiplicidad de infección [77].

Las concentraciones de células viables en los cultivos de ambas líneas fueron similares a lo largo de todo el tiempo de cultivo (Figura 19-c). Esto implica que las diferencias encontradas entre las dos líneas celulares en la producción de proteína total o cápsides de VAA, se deben a las diferencias en las productividades específicas y no a las concentraciones celulares en los cultivos.

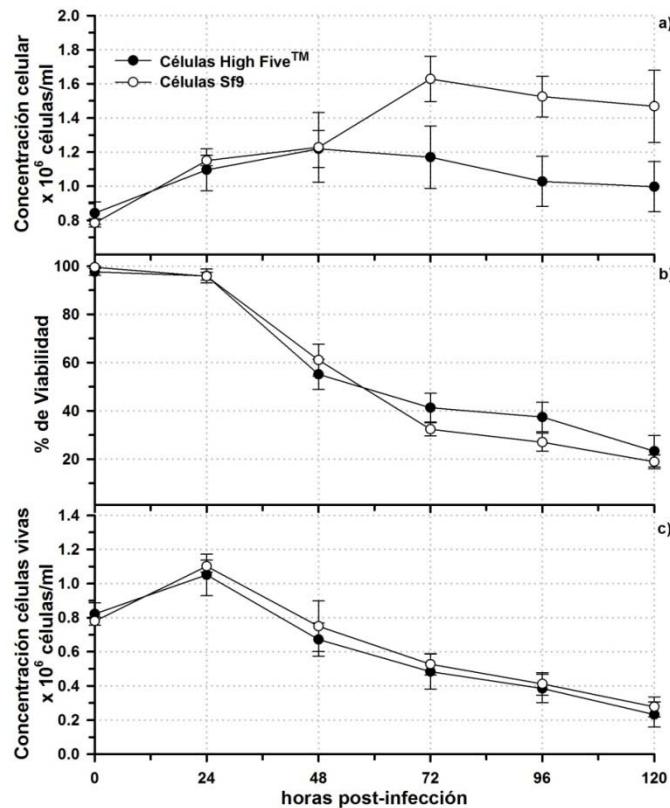


Figura 19.- Cinéticas de crecimiento de células Sf9 y High Five™ infectadas con el baculovirus bac Cap. a) Concentración total de células b) Porcentaje de células vivas y c) Concentración de células vivas. Se muestran los promedios y desviaciones estándar de los cultivos hechos por triplicado.

El comportamiento observado en los cultivos en cuanto a la concentración de células totales y la fracción de células viables producto de la infección con el baculovirus bac Cap

fue similar al reportado en otros trabajos [20,78,79]. Durante las primeras 24 horas no cambió la viabilidad y la concentración celular incrementó hasta en un 50%. Entre las 24 y 48 horas se observó un cese en el crecimiento celular así como el inicio en la disminución del porcentaje de células viables.

6.3.2 Producción de proteína total

La proteína total del cultivo incluye a la proteína celular, la proteína del medio, proteína del baculovirus y la proteína recombinante de interés. Con la determinación de proteína total se buscó identificar diferencias entre las líneas celulares en cuanto a su capacidad productora y la distribución de la proteína en el interior (extracto celular) o exterior (sobrenadante) de las células. Estos valores se compararon posteriormente con la concentración y distribución de la proteína recombinante de interés.

En la **figura 20** se muestran las concentraciones de proteína total encontradas. Ambas líneas celulares exhibieron perfiles de producción similares. Las mayores concentraciones de proteína total en el extracto celular y el sobrenadante se detectaron a las 48 y 72 hpi, respectivamente. La distribución de proteína entre el extracto celular y el sobrenadante cambió durante el cultivo, ya que hasta las 72 hpi la proteína total en el extracto celular representaba hasta el 80% del total detectado, mientras que a partir de este punto su porcentaje disminuyó hasta representar únicamente el 40%. El tiempo en el que este cambio se presentó coincide con la caída de la viabilidad por debajo del 50%. Las concentraciones de proteína total en pellet y sobrenadante se presentan en el **anexo A**.

La línea celular High FiveTM produjo alrededor de dos veces más proteína total que la línea celular Sf9. En ambas líneas, la mayor concentración de proteína se alcanzó a las 72 hpi. La caída de proteína total más allá de las 72 horas se debe muy probablemente a la acción de proteasas liberadas al medio producto de la lisis celular.

Se calculó el rendimiento de proteína total por célula ($Y_{P/t/x}$) dividiendo la concentración de proteína total sobre la concentración celular, la gráfica con estos valores se incluye en el **anexo B**. El $Y_{P/t/x}$ (ng/cél) para la línea Sf9 se mantuvo casi constante durante todo el

cultivo (0.66 ng/cél), mientras que para la línea High Five™ se presentó un incremento de poco más del doble a las 72 horas (2.11 ng/cél) con respecto al valor inicial (0.92 ng/cél). Estos resultados concuerdan con lo reportado por otros autores con respecto a que la línea celular High Five™ produce mayores cantidades de proteína que otras líneas celulares de insecto [80][81].

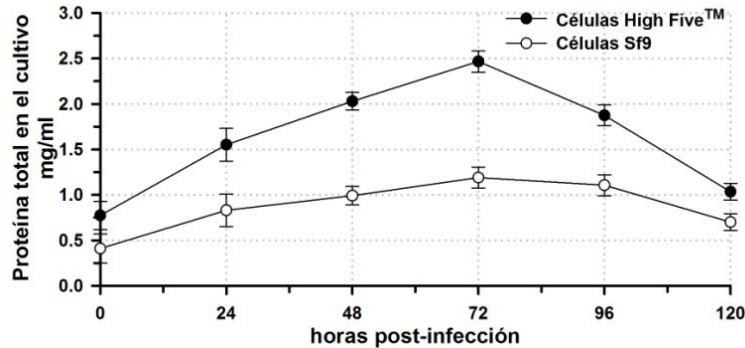


Figura 20.- Cinéticas de producción de proteína total en cultivos de células de insecto infectadas con el baculovirus bac-Cap. Cada punto de la gráfica representa la suma de la proteína en extracto celular y sobrenadante. Las barras representan la desviación estándar de los triplicados

6.3.3 Producción de proteína de la cápside de VAA (VP)

Las concentraciones relativas de proteína VP se determinaron mediante el análisis densitométrico de membranas de Western blot. Los Western blot se hicieron corriendo un gel por cada cultivo. Se analizaron muestras de extracto celular de 24, 48, 72, 96 y 120 horas, así como muestras de sobrenadante de 72, 96 y 120 horas. No se incluyeron muestras de sobrenadante de las 24 y 48 hpi, puesto que en ensayos previos se encontró que antes de las 72 hpi los niveles de proteína recombinante en esta fracción están por debajo del límite de detección del método. En todos los gels se incluyó el mismo control positivo con la finalidad de usarlo como referencia para las comparaciones entre diferentes membranas (Figura 21).

Para el análisis densitométrico se utilizó el programa Image J v. 1.41 (Wayne Rasband, National Institutes of Health). El programa calcula, a partir del área y la intensidad del color de cada una de las bandas observadas en el Western blot, un valor denominado “señal” que es proporcional a la cantidad de proteína en la banda analizada. Para cada

muestra se hizo la sumatoria de las señales procedentes de las proteínas de VAA (VP1 + VP2 y VP3). La estandarización se hizo substituyendo los valores de señal en la ecuación 8. El cálculo de la concentración relativa (con respecto al control) de proteína VP de VAA se hizo utilizando la ecuación 9. La comparación entre las distintas muestras se hizo utilizando el valor de concentración relativa.

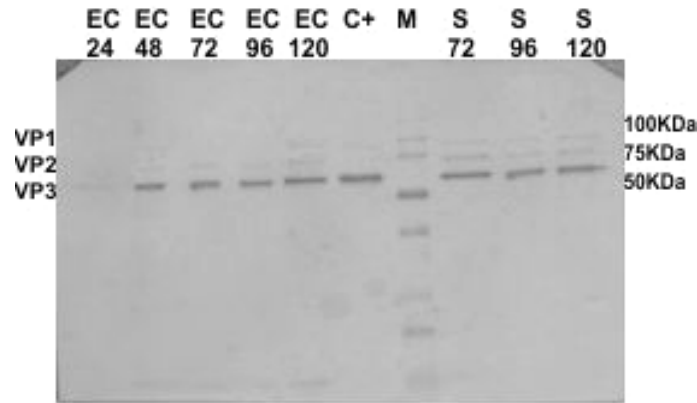


Figura 21.- Western blot de la detección de proteínas de la cápside de VAA en muestras de extracto celular (EC) y sobrenadante (S). Los números indican el tiempo post-infección de la muestra.

$$Señal\ normalizada\ (UR) = \frac{Señal\ de\ la\ muestra_{(VP1+VP2+VP3)}}{Señal\ del\ control_{(VP1+VP2+VP3)}} \quad \text{Ecuación 8}$$

$$Concentración\ relativa\ (UR/ml) = \frac{Señal\ normalizada}{Volumen\ muestra} \quad \text{Ecuación 9}$$

En la **figura 22** se muestran las cinéticas de producción de proteínas de VAA. Los valores representan la cantidad total de proteína de VAA por ml de cultivo y se obtuvieron a partir de la suma de la concentración relativa en extracto celular y en sobrenadante. El perfil de producción fue similar en ambas líneas celulares. Durante las primeras 72 hpi, la concentración de proteínas de VAA incrementó rápidamente. A partir de este tiempo se observó un incremento menos pronunciado, debido probablemente a la disminución en la concentración de células viables. Es de notar la diferencia de esta cinética con respecto a la de proteína total, en donde a partir de las 72 hpi se observó una disminución en la cantidad de proteína total presente en los cultivos.

Al comparar la concentración relativa de proteína de VAA producida por las dos líneas celulares no se observan diferencias estadísticamente significativas. Para ambas líneas se

observo un perfil de producción similar. De las 24 a las 72 hpi se detecto un considerable incremento en la concentración de proteína recombinante. Los cambios en la concentración de proteína recombinante entre las 72 y las 120 hpi no fueron significativos en ninguna de las dos líneas celulares. El comportamiento observado a partir de las 72 hpi se debe a la disminución en la cantidad de células viables capaces de producir la proteína de interés.

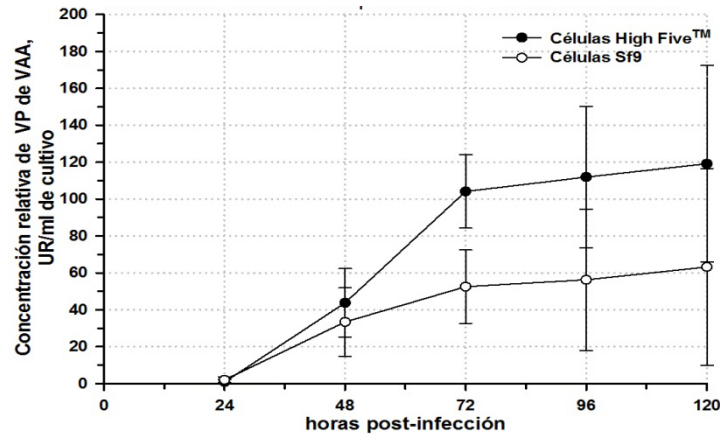


Figura 22.- Cinética de producción de la proteína de la cápside de VAA. La gráfica presenta la concentración volumétrica relativa y es resultado de la suma de la cantidad de proteína detectada en extracto más la detectada en sobrenadante.

La distribución de proteína de VAA entre el extracto celular y el sobrenadante de cultivo fue similar en ambas líneas celulares (**Anexo C**). A las 24 y 48 hpi, el 100% de proteína de VAA fue detectada en el extracto celular mientras que a partir de las 72 horas solo el 40% estaba en el extracto celular. Este comportamiento contrasta con lo reportado en otros trabajos, en donde a bajas multiplicidades de infección la mayor parte de la proteína recombinante se acumula en el pellet celular [78,82].

Se calculó el rendimiento de proteína recombinante por miligramo de proteína total ($Y_{Pr/Pt}$) para cada una de las muestras mediante la ecuación 10. En la **figura 23** se presentan los cambios de rendimiento en función del tiempo.

$$\text{Rendimiento} \left(\frac{\text{UR}}{\text{ml}} \right) = \frac{\text{Concentración relativa} \left(\frac{\text{UR}}{\text{ml}} \right)}{\text{Proteína total} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right)} \quad \text{Ecuación 10}$$

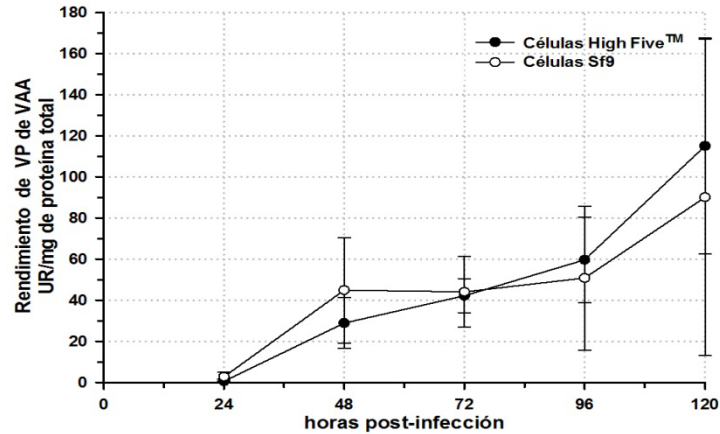


Figura 23.- Rendimientos de proteína recombinante de VAA por mg de proteína total en cultivos de células de insecto. Se presentan el promedio y desviación estándar de ensayos por triplicado

Las dos líneas celulares tuvieron rendimientos similares y en ambos casos el máximo se alcanzó a las 120 hpi. Es de notar el marcado incremento en el $Y_{Pr/Pt}$ durante la segunda mitad del cultivo, en donde la cantidad de células viables fue menor al 50% de la cantidad presente al inicio del cultivo. Esto es resultado de la combinación de dos fenómenos. Por un lado el ligero aumento en la concentración relativa de proteína recombinante entre las 72 y las 120 horas (**Figura 22**) y por el otro la disminución en la concentración de proteína total a partir de las 72 horas (**Figura 20**). Probablemente, la disminución de la concentración de proteína total a partir de las 72 hpi es resultado de la digestión de algunas proteínas presentes en el cultivo que son reutilizadas por las células para su mantenimiento, mientras que las PPV-VAA son capaces de escapar a este proceso. Se ha reportado que las PPV son resistentes a la actividad de las proteasas [21], ya que el corte proteolítico ocasionado por estas enzimas sobre las proteínas virales no es suficiente para producir la pérdida de la macroestructura de la partícula [83].

6.3.4 Producción de PPV-VAA

Los resultados obtenidos mediante el análisis densitométrico de los Western blot mostraron que desde las 72 hpi se obtuvieron altas concentración de proteína viral en los cultivos, sin embargo se tomó la decisión de determinar la concentración de PPV-VAA en las muestras de extracto celular y sobrenadante obtenidas a las 120 hpi. Esto tomando en cuenta el ligero incremento en la concentración de proteína durante las últimas horas de cultivo y a la posibilidad de dar más tiempo a las proteínas para ensamblarse en PPV. En

trabajos que han evaluado la producción de PPV-VAA o VAA recombinante también se ha encontrado que las concentraciones máximas se obtienen alrededor de las 120 hpi. [20,78,82]

En la **figura 24** se resumen los resultados del ensayo de ELISA practicado para cuantificar las PPV-VAA presentes en las muestras provenientes de los cultivos. Se encontró que en los cultivos de la línea High Five™ hasta el 58% de las PPV producidas se acumulan preferentemente en el extracto celular mientras que en la línea Sf9 el porcentaje de PPV encontrados en esta fracción representa tan solo el 43%. Se compararon las concentraciones de PPV-VAA en muestras de extracto celular, sobrenadante y totales entre cultivos de ambas líneas celulares. Solo se encontró diferencia estadísticamente significativa (prueba t-student con valor-p= 0.03 y potencia del 100%) entre las concentraciones en extracto celular, siendo un 80% mayor la cantidad de PPV producidas por la línea celular High Five El análisis estadístico realizado con los sobrenadantes y con las concentraciones totales arrojó un valor de potencia muy bajo (25%), tomando en cuenta que el valor recomendado es de 80%. Es muy probable que sí existan diferencias entre ambas líneas celulares, pero el número de muestras (triplicados) seleccionadas para este trabajo no permiten detectarlas.

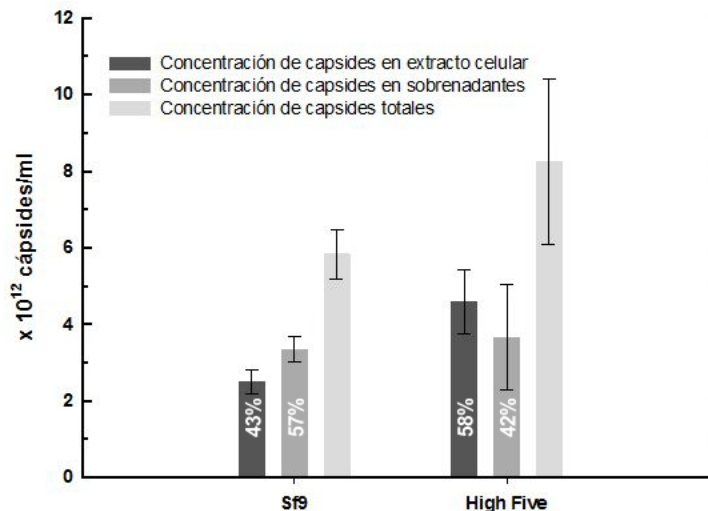


Figura 24.- Concentración de partículas pseudovirales de virus adeno-asociado; totales, en extracto celular y en sobrenadante de cultivos de células High Five™ y Sf9

La elección de las células High Five™ sobre las Sf9 como la línea productora de PPV-VAA para los fines de este trabajo está fundamentada en las mayores concentraciones de

partículas obtenidas bajo las condiciones de cultivo e infección ensayadas. Una razón más para la selección de esta línea es el mayor rendimiento ($Y_{Pr/Pt}$) obtenido. Esto implica que la cantidad de proteínas contaminantes que deben ser removidas durante el proceso de purificación es menor, lo que facilita la obtención de PPV-VAA puras. Otros grupos de trabajo han encontrado resultados similares en la producción de PPV entre la línea High FiveTM y la Sf9. Se ha demostrado que la línea High FiveTM produce hasta 5 veces más PPV de rotavirus que la Sf9 [84].

Los experimentos realizados en la primera parte de este trabajo mostraron que existe una diferencia en la producción de PPV-VAA entre las líneas High FiveTM y Sf9. Aparentemente esta diferencia no se debe a la mayor producción de proteína viral, por lo que es posible que se deba a que High Five promueve de forma más eficiente el ensamblaje de las PPV. Un fenómeno similar ha sido reportado en la producción de PPV del virus de la enfermedad de bursitis infecciosa [85], así como en la producción de PPV de CPV [55]. Con base en estos resultados se tomó la decisión de utilizar la línea High Five para la producción de PPV-VAA en el resto del proyecto.

Se seleccionó la fracción correspondiente al extracto celular para proseguir con los ensayos de purificación debido a que en el sobrenadante se acumula una mayor cantidad de baculovirus y las proteínas que lo conforman (no se muestran los datos). Las características de estas proteínas, sobre todo de la gp64 presente en la membrana del baculovirus, hacen que sea difícil separarlas de las cápsides de VAA. La menor cantidad de contaminantes de esta naturaleza en el extracto celular permitió obtener mejores resultados en los procesos de purificación.

6.4 PURIFICACIÓN DE PPV-VAA

La cromatografía de intercambio iónico es considerada la técnica más robusta y versátil para la purificación de VAA [86]. Para los diferentes serotipos de VAA, se han estudiado métodos cromatográficos basados en el uso de resinas tanto de intercambio aniónico como catiónico. En el caso particular del VAA tipo 2 (VAA-2), la mayoría de los reportes de purificación emplean resinas de intercambio catiónico como el paso primario o de captura

[69,70], dejando el uso de las resinas de intercambio aniónico para las etapas de pulido [87,88]. Sin embargo, decidimos desarrollar un primer paso de purificación basado en intercambio aniónico (resina Q-sepharose fast flow) debido al éxito que se ha tenido en nuestro grupo para la purificación de otras proteínas virales mediante esta metodología, tales como VP6 de rotavirus [77] y el antígeno de superficie del virus de la hepatitis B [89].

6.4.1 Selección de pH para la purificación por intercambio aniónico

La cromatografía de intercambio aniónico tiene como fundamento la separación de moléculas con base en la carga que poseen en su superficie y la interacción electrostática que se presenta entre las mismas y las partículas esféricas que conforman la resina. La carga eléctrica de una molécula depende en gran medida del pH del medio en el que se encuentra. Es por esto que la elección de valores de pH y fuerza iónica de la fase móvil son críticas, ya que se debe garantizar que la molécula de interés se una a la resina en las condiciones iniciales de purificación y que la mayor cantidad posible de contaminantes no lo hagan. Para determinar en qué pH el VAA se une a la resina de intercambio aniónico se montó un experimento sencillo que se describe en la sección 5.6.1 de materiales y métodos.

Se realizaron análisis de proteína total (Bradford), contenido de cápside (Dot-blot con anticuerpo A20) y contenido de proteínas de VAA y baculovirus (Western blot con anticuerpos B1 y Fast Plax respectivamente) para cada una de las fracciones colectadas. Las inmunodetecciones fueron analizadas mediante densitometría, como se describió previamente. El porcentaje de proteína que se recuperó en cada etapa de elución con respecto a la cantidad de proteína cargada inicialmente (3.4 mg) se calculó a partir de los volúmenes (V_E) y la concentración de proteína ($[Pt]_E$) en los sobrenadantes usando la ecuación 11.

$$\text{Porcentaje de proteína total por etapa} = \frac{[Pt]_E \cdot V_E}{[3.4mg]} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 11}$$

De manera similar, se uso la ecuación 12 para calcular el porcentaje de PPV-VAA que se recuperaron después de cada etapa de elución

$$\text{Porcentaje de PPV-VAA por etapa} = \frac{S_{E=n}}{\sum_{E=1}^{E=5} S_{E=n}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 12}$$

donde $S_{E=n}$ corresponde a la señal del Dot-blot de la etapa n, donde n representa las etapas de carga (1), lavado (2) y eluciones con 150 mM (3), 500 mM (4) o 1 M de NaCl (5). El denominador corresponde a la suma de la señal de las cinco etapas.

La proteína y PPV-VAA recuperados en el sobrenadante de las dos primeras etapas (carga y lavado) representan la fracción que no se adsorbe en la resina bajo las condiciones ensayadas, mientras que lo recuperado durante las etapas de elución con NaCl representa la fracción de los analitos que se adsorbe a la resina. Para fines de comparación entre los diferentes valores de pH se graficaron los porcentajes de proteína total y de PPV-VAA que se unieron a la resina de intercambio aniónico (**Figura 25**). Estos valores se calcularon mediante la sumatoria de lo recuperado en las etapas de elución con NaCl (etapas 3, 4 y 5).

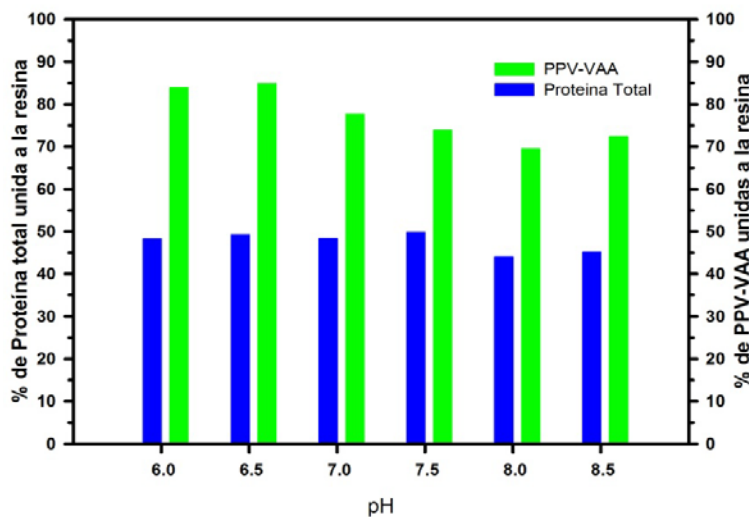


Figura 25.- Efecto del pH sobre la unión de proteína total y PPV-VAA a la resina de intercambio aniónico. El incremento en el pH ocasionó una disminución en la cantidad de PP-VAA que se unieron a la resina y no tuvo efecto sobre la cantidad de proteína total unida a la misma.

La fracción de proteína total unida a la resina fue similar a los distintos valores de pH estudiados y es de aproximadamente el 50%, mientras que el porcentaje de PPV-VAA que se unió a la resina incrementó ligeramente al aumentar el pH de la solución amortiguadora de 6.0 a 6.5. El incremento del pH en la solución amortiguadora por arriba de 6.5 ocasionó que una menor cantidad de cápsides se adsorbieran a la resina.

Con base en los resultados obtenidos, se concluyó que llevar a cabo una primera etapa de purificación mediante intercambio aniónico a pH 6.5 permitiría eliminar alrededor del 51% de las proteínas contaminantes, con una recuperación del 85% del contenido inicial de

PPV-VAA. Es importante señalar que los reportes de purificación mediante intercambio iónico para VAA no son consistentes en cuanto al valor de pH apropiado para llevar a cabo el proceso, ya que es posible encontrar métodos de intercambio catiónico [87] y aniónico [88] en los que el pH de la fase móvil es el mismo y en ambos casos las PPV-VAA se unen a las resinas. Por esta razón fue difícil determinar si nuestros resultados concuerdan en general con lo reportado por otros autores.

El análisis por Western blot contra las proteínas VP de VAA y gp64 de baculovirus mostró que, si bien ambos virus se unen a la resina de intercambio iónico, es posible separarlos mediante la elución con soluciones amortiguadoras de distintas fuerzas iónicas, ya que para desprender las PPV-VAA de la resina es suficiente una solución 150 mM de NaCl, mientras que para el baculovirus es necesario usar una solución 500 mM de NaCl (Figura 26).

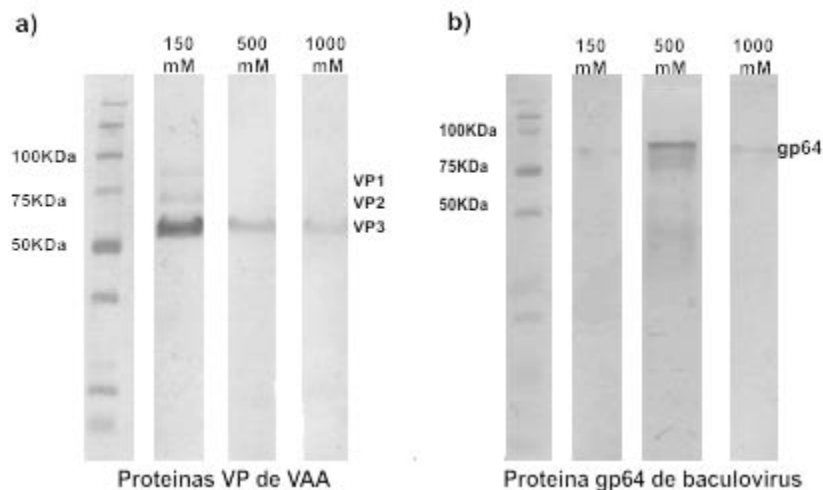


Figura 26.- Western blot de muestras de las etapas de elución 3, 4 y 5 con a) anticuerpo B1 (VP de VAA) y b) anticuerpo Fast Plax (gp64 de baculovirus).

6.4.2 Cromatografía de intercambio aniónico

A partir de los resultados de selección de pH se diseñó el siguiente proceso cromatográfico de purificación. Se empacaron 25 ml de resina Q Sepharose Fast Flow en una columna XK-16 (GE Healthcare, USA). Se utilizaron como fase móvil soluciones amortiguadoras de Tris 50 mM pH 6.5 (solución A) y Tris 50 mM- NaCl 1000 mM pH 6.5 (solución B). Las muestras se prepararon a partir del extracto celular de cultivo de células

High Five™ mediante dos etapas. En una primera etapa se concentraron en un sistema agitado (Amicon, Bioseparations, Millipore) con membrana de celulosa regenerada de MWCO= 30,000 Da, hasta disminuir el volumen a un 40% del original. En la segunda etapa los extractos celulares se diluyeron 1:1 con solución A, esto con la finalidad de disminuir la fuerza iónica de la muestra. Cada ciclo de purificación se llevó a cabo como se describe en materiales y métodos con la inyección de un máximo de 25 ml de muestra por ciclo. Se colectaron fracciones de 3 ml a partir del inicio del gradiente (100 ml) y hasta el final de la corrida (360 ml), las cuales fueron analizadas mediante Dot blot (500 µl de cada muestra) con el anticuerpo A20 con la finalidad de identificar el volumen de elución de las PPV-VAA.

En la **figura 27** se muestra un cromatograma típico del proceso de intercambio aniónico en el que la región sombreada corresponde al volumen de elución de las fracciones que resultaron positivas a PPV-VAA. Una gran parte de los contaminantes presentes en el extracto celular pasan a través de la resina sin ser absorbidos, razón por la cual eluyen antes de que se inicie el gradiente lineal de NaCl, tal como se puede apreciar a partir de la curva de absorbancia.

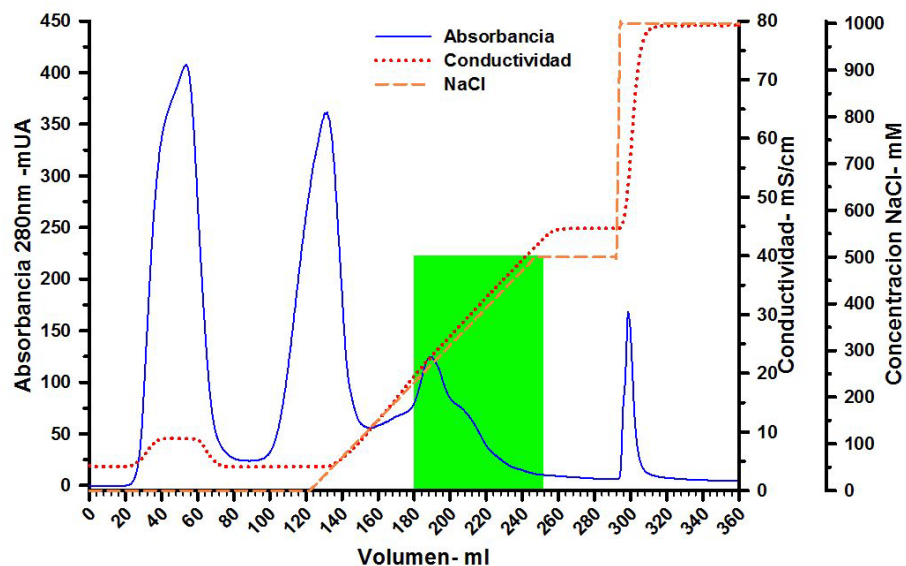


Figura 27.- Cromatograma de la purificación de PPV-VAA mediante intercambio aniónico. La región sombreada corresponde a las fracciones que resultaron positivas a PPV-VAA tras su análisis mediante Dot-blot. La línea continua indica la absorbancia a una longitud de onda de 280nm y las líneas punteadas indican la conductividad y concentración de cloruro de sodio de la fase móvil.

El incremento en la concentración de NaCl es el responsable de la desorción de las PPV-VAA. El valor de conductividad de la primera fracción positiva a VAA fue de 18 mS/cm, lo que corresponde a una concentración de 176 mM de NaCl en la fase móvil. Este valor es 18% superior al esperado, ya que en el ensayo de selección de pH la elución de las PPV-VAA se logró con una solución 150 mM. La última fracción positiva a VAA presentó una conductividad de 44 mS/cm, equivalente a una concentración de 500mM de NaCl. Durante la última etapa del proceso cromatográfico se incrementó la concentración de NaCl en la fase móvil hasta 1 M, lo que ocasionó un incremento en la absorbancia producto de la elución de las sustancias contaminantes que se unieron con más fuerza a la resina.

Las fracciones colectadas durante la cromatografía se distribuyeron en 3 grupos, fracciones colectadas entre 0 y 180 ml (F1), fracciones positivas a PPV-VAA (F2) y fracciones colectadas entre los 260 y 360 ml (F3). Las fracciones del mismo grupo se mezclaron y se concentraron mediante ultrafiltración hasta reducir el volumen a $\frac{1}{10}$ de su valor original. Los grupos se analizaron mediante Western blot contra las proteínas de la cápside de VAA y contra la proteína gp64 de baculovirus. (**Figura 28**).

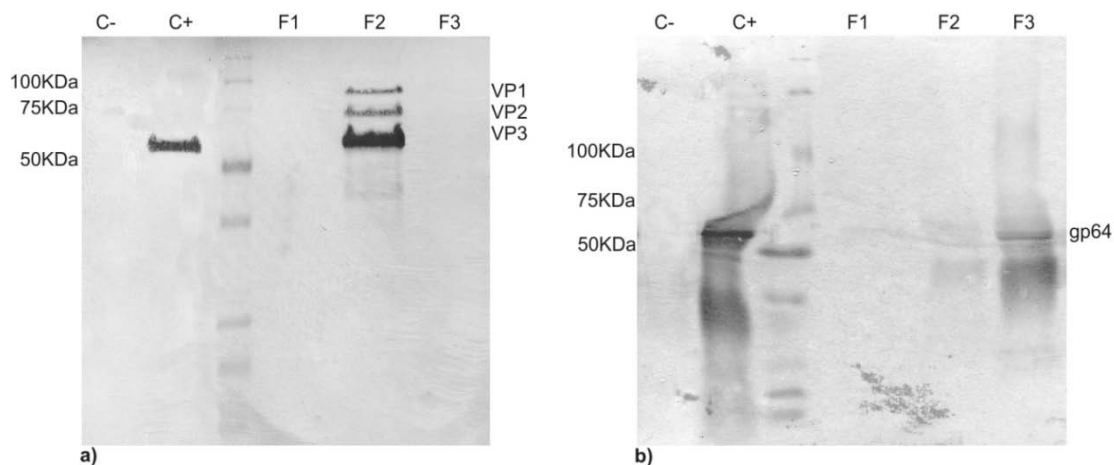


Figura 28.- Análisis mediante Western blot de la distribución de proteínas VP de VAA (a) y gp64 de baculovirus (b) en diferentes fracciones del proceso de purificación mediante intercambio aniónico. F1 fracciones colectadas entre los 0 y 180 ml, F2 fracciones colectadas entre 180 y 255 ml (positivas a PPV-VAA) y F3 fracciones colectadas entre los 260 y los 360 ml.

Acorde a lo esperado, las PPV-VAA y el baculovirus eluyeron en fracciones diferentes. La necesidad de una mayor fuerza iónica para desprender al baculovirus de la resina de intercambio aniónico concuerda con el bajo valor de punto isoeléctrico ($pI= 3.15$) de la

proteína gp64 [90], que es la proteína más abundante de la envoltura viral y contribuye en gran medida a la carga superficial del baculovirus (-15mV, a pH 6.5) [91].

Cabe destacar que las proteínas estructurales del VAA fueron detectadas exclusivamente en muestras del grupo dos (F2). Esto indica que la proteína viral tiene una afinidad similar a la resina, aún si está ensamblada o no. Otra posibilidad es que toda la proteína de VAA presente en el extracto celular este ensamblada.

6.4.3 Centrifugación isopícnica

La pureza alcanzada durante la purificación de PPV-VAA mediante intercambio aniónico fue aproximadamente del 63%, lo que es insuficiente para llevar a cabo su caracterización fisicoquímica. Para incrementar la pureza se procedió a hacer centrifugación isopícnica en iodixanol. Procesos de purificación de VAA que combinan etapas de cromatografía con etapas de centrifugación han sido reportadas previamente [83,92].

El iodixanol ([5,5'-(2-hidroxi-1,3-propanodiol)-bis(acetilimino)]bis-[N,N'-bis(2,3-dihidroxipropil)-2,4,6-triyodo-1,3-benzenocarboximida]) es una sustancia desarrollada inicialmente como medio de contraste para estudios de rayos X. Su uso como medio para la formación de gradientes en centrifugación se propuso en 1994 [93]. Desde entonces, gracias a sus propiedades (baja toxicidad, carácter no iónico, isosmótico a concentraciones de trabajo, etc.), ha ganado terreno frente a otras sustancias para su uso en la purificación de componentes biológicos.

La purificación de VAA mediante gradiente isopícnico en iodixanol presenta claras ventajas frente al uso de CsCl. Es posible disminuir los tiempos de proceso [94], se obtienen mayores rendimientos [70], además de que su uso contribuye a evitar la agregación de los VAA durante la purificación [86]. Para la purificación de las PPV-VAA se hizo una adaptación del método descrito por Zolotukhin y colaboradores, detallado en la sección de materiales y métodos [70]. El material de partida para la centrifugación fue el concentrado de la fracción F2 obtenida mediante intercambio aniónico. En la **figura 29-a** se muestra la fotografía del gradiente, en el que se observaron dos bandas que fueron colectadas. Se midió el índice de refracción de las bandas y se calculó la densidad de las

mismas, obteniendo valores de 1.13 g/cm^3 y 1.09 g/cm^3 . Sólo la banda más densa resultó positiva para PPV-VAA. La **figura 29-b** es una micrografía electrónica de las PPV-VAA encontradas en la banda 2 (B2) y en la figura 29-c se muestra la distribución de tamaño de partícula en la misma banda, determinada mediante dispersión dinámica de luz.

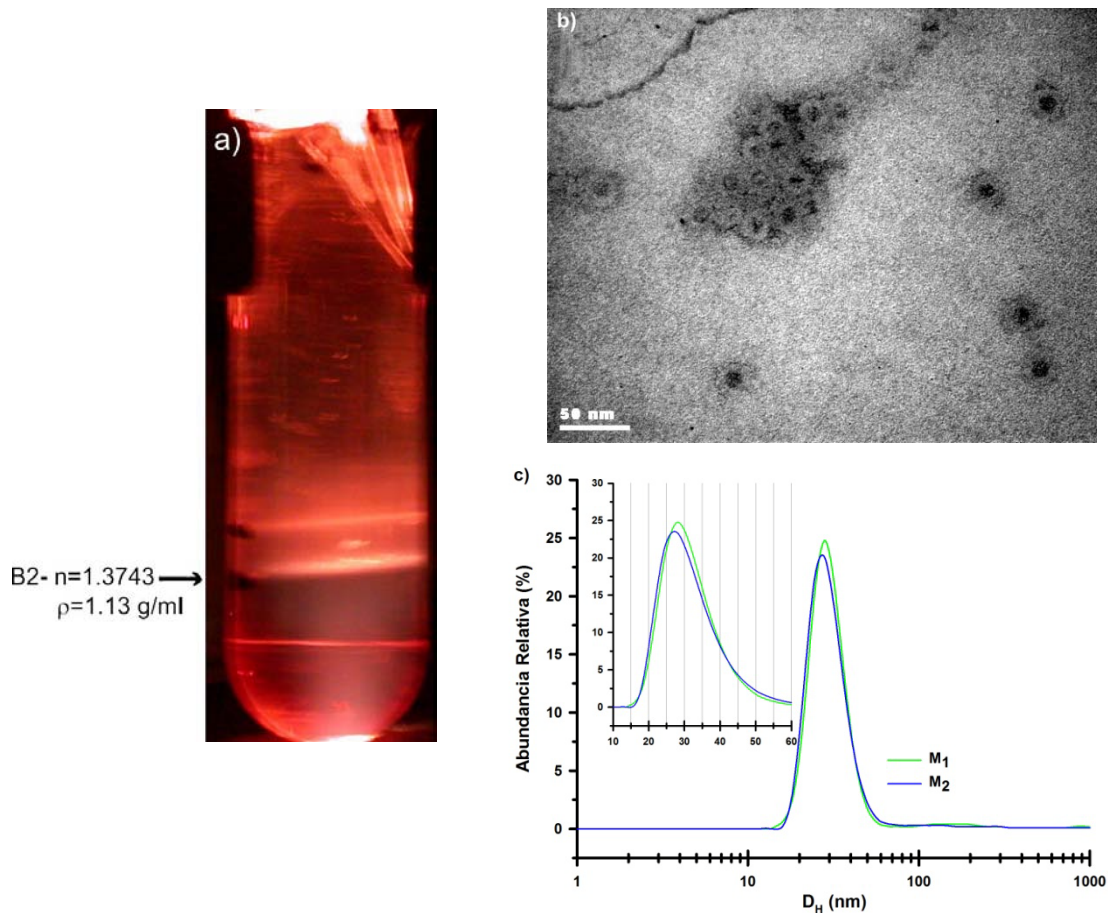


Figura 29.- Purificación de PPV-VAA mediante centrifugación isopícnica en iodixanol) Imagen obtenida después de la centrifugación. Se indican el índice de refracción (n) y la densidad de la banda positiva a PPV-VAA. b) Micrografía electrónica de transmisión (250,000X) de PPV-VAA en la banda colectada (B2). c) Distribución de tamaño de partícula obtenida mediante dispersión dinámica de luz de la banda colectada. M1 y M2 representan la distribución de tamaño de dos muestras purificadas de forma independiente.

La densidad de la banda positiva a PPV-VAA fue menor que la reportada para PPV-VAA purificadas mediante gradientes en CsCl, que varía entre 1.30 y 1.33 g/ml [95]. Esta diferencia en las densidades también se ha observado en el VAA silvestre, ya que al purificar mediante gradiente de CsCl se obtiene una densidad de 1.41 g/ml [95,96], mientras que al hacerlo mediante iodixanol se obtienen densidades de 1.26 g/ml [70,94].

Esta diferencia es atribuida a la baja actividad de agua que presenta el CsCl en solución (Axies-Shield 2009- Application Sheet V31).

El diámetro hidrodinámico (D_H) promedio determinado por DLS de las PPV-VAA presentes en la banda colectada fue de 28.1 nm. Este valor es un 17% mayor al que se observó en las micrografías electrónicas, que es de 23.8 nm, y también es mayor al reportado en la literatura, que oscila entre 20 y 25nm. Esta diferencia se debe a que la técnica de dispersión de luz toma en cuenta como parte de las partículas analizadas la nube de contraiones que las rodea [97], lo que evidentemente resulta en un tamaño mayor al obtenido mediante la inspección de las partículas al microscopio electrónico.

El grado de pureza alcanzado al final del proceso de purificación fue del 99%, determinado mediante el análisis densitométrico de muestras en geles teñidos con plata. En la **figura 30** se presenta un gel de poliacrilamida teñido con plata y un Western blot de las distintas etapas del proceso de purificación.

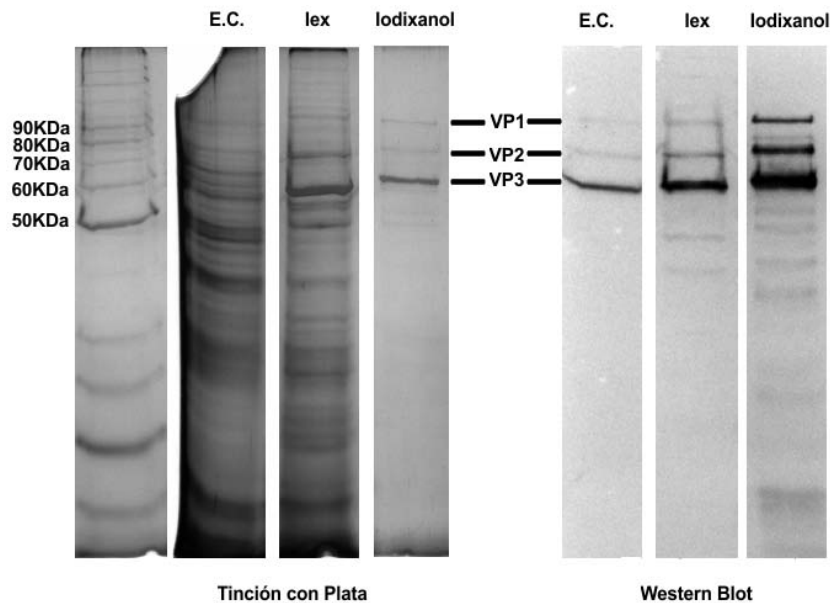


Figura 30.- Tinción de plata y Western blot con el anticuerpo A1 (extremo C terminal de proteínas de VAA) de muestras obtenidas a partir de distintas etapas del proceso de purificación. Extracto celular (EC), fracción dos del proceso de intercambio iónico (Iex), banda 2 del proceso de centrifugación isopícnic en iodixanol (Iodixanol).

6.5 ANÁLISIS DE PPV-VAA MEDIANTE CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN EN GEL ABSOLUTA.

La agregación es uno de los principales problemas que disminuyen la eficiencia y vida útil de las proteínas terapéuticas, además de constituir una limitante durante la caracterización fisicoquímica de las mismas [98]. La agregación de VAA recombinante durante su purificación y almacenamiento ha sido reportada por varios autores y es considerada una de las causas de la pérdida de capacidad transductora de este vector viral. Este antecedente y la amplia distribución de tamaño de partícula obtenida para las muestras purificadas mediante gradientes isopícnicos, señal de la posible presencia de partículas agregadas (**Figura 27-c**), nos motivaron a llevar a cabo un análisis que permitiera diferenciar entre PPV-VAA monoméricas, agregadas y la posible presencia de proteína viral no ensamblada.

En nuestro laboratorio Mena y colaboradores [99] y Fabián-Macedo [89] desarrollaron métodos de cuantificación mediante cromatografía de exclusión en gel para PPV derivadas de rotavirus y del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B respectivamente. Ambos métodos utilizan la columna Ultrahydrogel 500 (Waters) y mediante estos es posible cuantificar no sólo las PPV si no también los intermediarios del proceso de ensamblaje. Sin embargo presentan un inconveniente, ya que se debe calibrar el sistema cromatográfico con proteínas de D_H conocido si se alteran las condiciones del análisis tales como la temperatura o la fase móvil.

El uso de detectores sensibles a peso molecular, tales como viscosímetros o detectores de dispersión de luz (DLS, multiple angle light scattering (MALS), etc), permiten llevar a cabo la cromatografía de exclusión en gel sin la necesidad de calibrar las columnas, lo cual representa un ahorro de tiempo y permite explorar con mayor facilidad las condiciones óptimas para la separación de los analitos de interés [100]. Mediante la combinación de cromatografía de exclusión molecular y detectores de dispersión de luz, técnica denominada exclusión molecular absoluta (ASEC), se ha estudiado la presencia de agregados en preparaciones de anticuerpos [63] y en muestras de virus de la influenza destinadas al desarrollo de vacunas [101].

A partir del trabajo de Fabian-Macedo [89] desarrollamos un método cromatográfico en el que se incorporó el detector de dispersión dinámica de luz lo cual nos permitió

identificar las diferentes poblaciones presentes en una muestra de PPV-VAA. Para el análisis de las PPV-VAA se hizo el cambio de la fase móvil propuesta por Fabian-Macedo (20 mM Na₂HPO₄) a la utilizada por Smith y colaboradores [102] en trabajos de purificación de VAA mediante cromatografía de permeación en gel (PBS pH 7.2 adicionada de MgCl₂ 2mM).

A partir de los perfiles de elución de diferentes proteínas globulares y la curva de calibración (Ecuación 13) propuesta por Fabián-Mecedo para la columna Ultrahydrogel 500, se definieron tres regiones del cromatograma. Región 1, de 0 a 6 ml en donde se esperaba la elución de partículas con un D_H mayor a 25nm, región 2 entre 6 y 8.5 ml, donde se esperaba la elución de partículas entre 25 y 18 nm, región 3, que va más allá de los 8.5 ml de volumen de elución.

$$R_H = 25.557(1 - K_D) - 9.9888 \quad \text{Ecuación 13}$$

donde :

$$K_D = \frac{V_E - V_O}{V_T - V_O},$$

V_E = volumen de elución del analito

V_O = Volumen muerto de la columna

V_T = Volumen total de la columna

Para el desarrollo del método se inyectaron muestras de PPV-VAA purificadas mediante doble gradiente isopícnico en CsCl. Los cromatogramas obtenidos (**Figura 31**) indican que las muestras inyectadas contienen al menos 4 poblaciones de partículas detectables mediante la medición de la absorbancia a 280nm (línea continua). Los volúmenes de elución de las 4 poblaciones son 4.8 ml, 7.0 ml, 9.36 ml y 9.8 ml, respectivamente. La segunda población se encuentra, según la ecuación 12, dentro del rango de elución esperado para las PPV-VAA. La medición mediante dispersión dinámica de luz (línea discontinua y puntos negros) mostró la presencia de tres poblaciones de 44.03 ± 15 nm, 24.7 ± 4.1 nm y 15.1 ± 2.8 nm, respectivamente. Cada una de éstas eluyó en los volúmenes calculados a partir de la ecuación 12.

Las diferencias observadas entre ambos cromatogramas (líneas continua y discontinua) son debidas a la medición de diferentes propiedades fisicoquímicas de las partículas que

circulan por el sistema. Los detectores de dispersión dinámica de luz son muy sensibles a las partículas grandes, debido a la enorme dependencia de la cantidad de luz dispersada (I_L) con respecto al diámetro de las partículas ($I_L \propto [C_p] \times (D_H)^6$). Esto explica que las abundancias relativas de cada población aparezcan invertidas entre los cromatogramas.

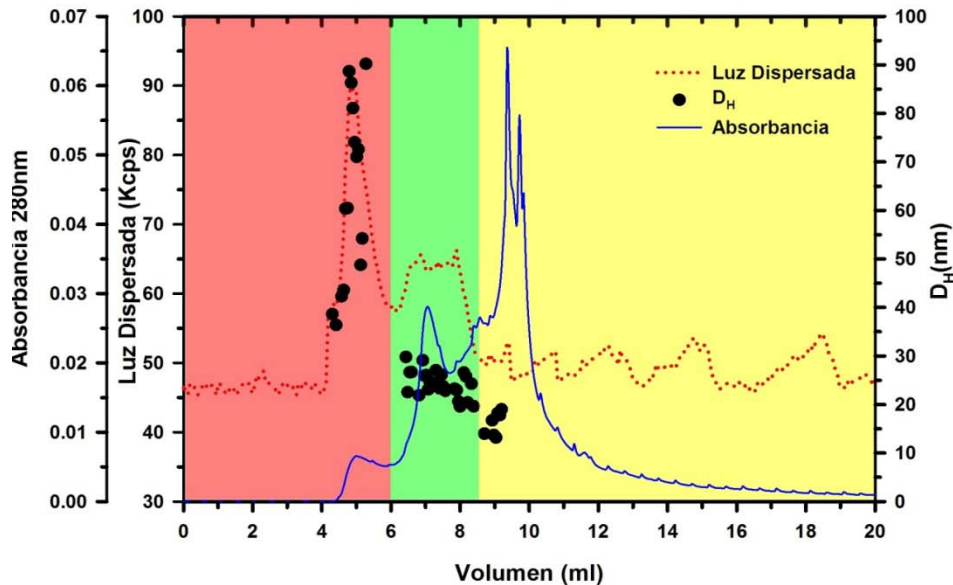


Figura 31.- Cromatograma del análisis mediante cromatografía de exclusión en gel de muestras de PPV-VAA purificadas mediante doble gradiente en CsCl. El sombreado en el cromatograma indica las tres regiones diferentes definidas mediante el uso de la ecuación 13.

Para comprobar si las partículas de 24 nm detectadas por el DLS eran PPV-VAA, se colectaron fracciones de 1ml desde los 5 ml de volumen de elución hasta los 11 ml y se utilizaron para un ensayo de Slot blot con el anticuerpo A20. El resultado muestra que en las fracciones comprendidas entre los 6 y los 8 ml se detectaron PPV-VAA (Figura 32).

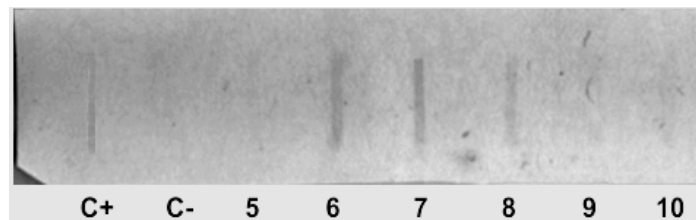


Figura 32.- Detección de PPV-VAA intactas mediante Slot blot con el anticuerpo A20 en fracciones colectadas durante la cromatografía de exclusión en gel absoluta. Control positivo (C+), control negativo (C-), los números indican el volumen de elución de la fracción analizada

Con la finalidad de evaluar el grado de pureza de las PPV-VAA purificadas por intercambio aniónico, doble gradiente de CsCl o una combinación de intercambio aniónico-

gradientes de iodixanol, se analizaron muestras provenientes de estos procesos de purificación mediante cromatografía de exclusión en gel absoluta.

En la **figura 33** se muestran los cromatogramas de cada una de las muestras. De acuerdo a los resultados previos, las sustancias que eluyeron antes de los 6 ml o después de los 9 ml no son PPV-VAA. Se observa que la muestra proveniente del proceso de purificación por intercambio aniónico presentan una gran cantidad de sustancias contaminantes de un tamaño menor a 18 nm. Inclusive se observaron sustancias con volúmenes de elución mayores al volumen total de la columna, lo que indica interacciones inespecíficas con la matriz de la columna [103]. Se presume que estas sustancias son proteínas, ya que el espectro de absorción de estas fracciones mostró el perfil característico de este tipo de biomoléculas (datos no mostrados).

Los cromatogramas de las muestras purificadas por doble gradiente de CsCl y por intercambio aniónico-gradiente iodixanol, presentan perfiles similares y se observa que la pureza alcanzada fue mayor que la de muestras que pasaron solo por la etapa de intercambio aniónico.

Se observa una mayor pureza en muestras purificadas mediante intercambio aniónico-gradientes iodixanol. Los picos observados a los 10 y 11.5 ml de volumen de elución no presentaron el espectro característico de una proteína y fueron similares a los espectros de la azida de sodio y el iodixanol, respectivamente. La azida de sodio se incluye en las muestras como conservador. Se calculó el área bajo la curva de absorción para el cromatograma desde el volumen 0 hasta los 9.5 ml y se determinó el contenido relativo de partículas con D_H entre 18 y 25 nm, que fue de 87%. Este valor es considerablemente bajo tomando en cuenta que la pureza de esta muestra determinada mediante análisis densitométrico de una tinción con plata fue del 99%. Sin embargo es importante recordar que en la tinción con plata sólo las proteínas no virales constituyen impurezas, mientras que en el cromatograma los agregados, formados probablemente por la misma proteína viral, son considerados impurezas.

Este es a nuestro saber, el primer trabajo en donde se reporta la ASEC para el análisis de muestras con PPV-VAA. Los resultados confirman reportes previos que indican que la purificación de PPV-VAA mediante la combinación de cromatografía de intercambio

aniónico y gradientes en iodixanol permiten obtener preparaciones de mejor calidad que las obtenidas mediante gradientes de CsCl [86,104].

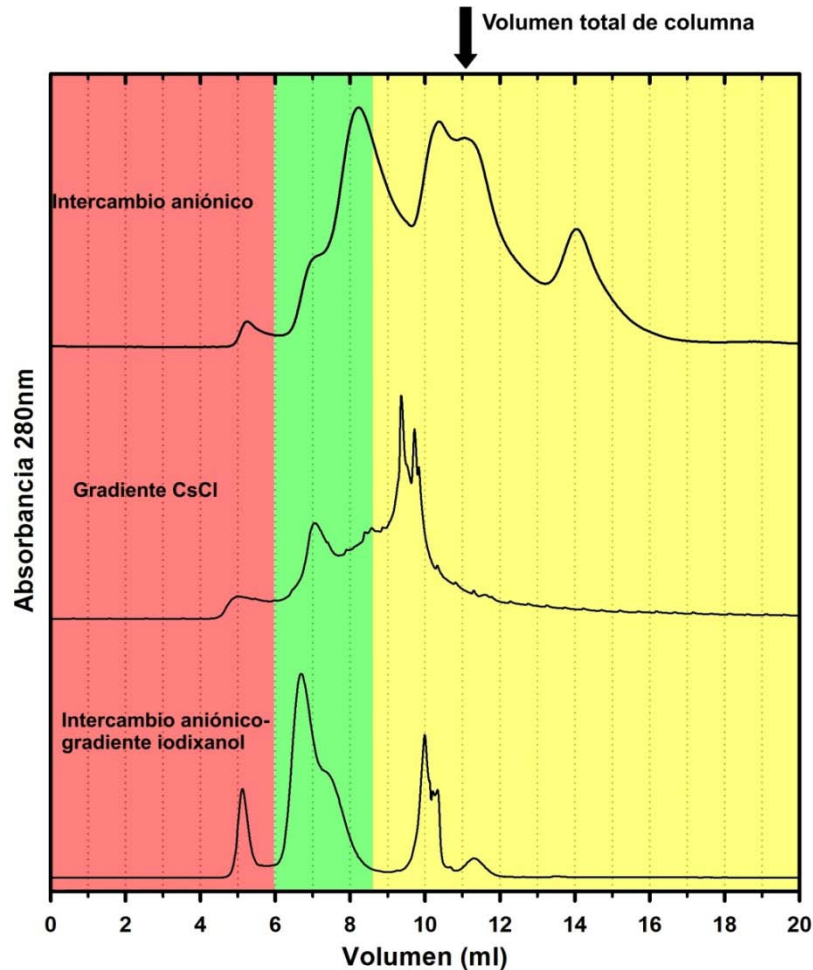


Figura 33.- Perfiles cromatográficos obtenidos mediante exclusión molecular de muestras de PPV-VAA purificadas mediante diferentes técnicas. El sombreado en el cromatograma indica las tres regiones diferentes definidas mediante el uso de la ecuación 13.

6.6 CARACTERIZACIÓN FISCOQUÍMICA DE PPV-VAA

Los ensayos realizados durante la caracterización fisicoquímica tuvieron por objeto el generar conocimiento respecto a la estabilidad de las PPV-VAA, así como identificar posibles cambios estructurales en las partículas que nos permitieran proponer estrategias para introducir fluoresceína al seno de las mismas. Intentamos identificar cambios conformacionales similares a los reportados en otras PPV y que han resultado útiles para el

desarrollo de sistemas de entrega tales como: el proceso reversible de desensamblaje controlado y la expansión radial de algunas PPV lo que provoca la aparición de poros que conectan la región interior y exterior de las mismas. Los cambios estructurales que logramos identificar fueron diferentes a los que esperábamos encontrar originalmente.

6.6.1 Distribución de tamaño de PPV-VAA en soluciones con diferentes fuerzas iónicas.

Con el objetivo de identificar las condiciones capaces de mantener a las PPV-VAA en estado monomérico, alícuotas de 1 ml de PPV-VAA fueron diafiltradas y concentradas con diversas soluciones. Algunas de las soluciones evaluadas en este trabajo se encuentran reportadas en artículos dedicados a identificar factores asociados a la agregación de diferentes partículas pseudovirales [69,105,106]. Para evitar la agregación de PPV-VAA en solución se ha propuesto el uso de diferentes sustancias, tales como glicerina [31,107] Pluronic F68 [105], sacarosa [108] y diferentes sales a fuerzas iónicas por encima de 200mM [109]. En la **tabla 2** se presenta la composición de cada solución. Las partículas se diafiltraron en centricones de 0.5 ml y MWCO 100 kDa (Millipore). La diafiltración se hizo con 10 ml de cada solución y las muestras se concentraron hasta un volumen final de 100 μ l. Al término del proceso de diafiltración-concentración se analizaron las muestras mediante dispersión dinámica de luz.

Tabla 2.- Composición, fuerza iónica y pH de soluciones utilizadas para la diafiltración - concentración de PPV-VAA

Solución	Composición	Fuerza iónica (mM)	pH	Referencia
A	H ₂ O	0	6.5	-
B	PBS + Sacarosa 5%	167	7.5	[105]
C	MgSO ₄ 60mM Tris 60mM	250	8.0	-
D	MgSO ₄ 90mM Tris 60mM	371	8.0	-
E	Citrato trisódico 100mM Tris 10mM	598	8.0	[109]
F	(NH ₄) ₂ SO ₄ 660mM, Hepes 50mM, MgCl ₂ 2mM, sacarosa 2%	1900	7.5	[69]

La cantidad inicial de luz dispersada de las alícuotas de PPV-VAA fue de 431 ± 38 kcps. La intensidad de luz dispersada es proporcional al D_H y a la concentración de las partículas ($I_L \propto [C_p] \times (D_H)^6$). Al concentrar las muestras desde 1 ml hasta 100 μ l, se esperaba obtener un incremento de 10 veces en la intensidad de luz dispersada.

Los resultados del análisis de dispersión de luz nos llevaron a dividir a las soluciones empleadas para el ensayo en dos grupos. En el primero de ellos colocamos a aquellas soluciones en las que después de la diafiltración-concentración fue posible detectar una población de partículas con un diámetro hidrodinámico menor a 40 nm, lo que indica la presencia de PPV-VAA en estado monomérico (**Figura 34-a**), mientras que en el segundo grupo colocamos a las soluciones cuya distribución de tamaño de partícula no mostró PPV en estado monomérico (**Figura 34-b**).

En las muestras diafiltradas con la solución E se obtuvo el mayor porcentaje de PPV-VAA en estado monomérico, según se observó a partir de los datos de D_H promedio y porcentaje presentados en la figura 34-a. Por otro lado, en las muestras diafiltradas con solución B también se identificó una pequeña fracción de partículas no agregadas, a pesar de poseer una fuerza iónica menor a 200 mM, lo que según Wright y colaboradores es indispensable para mantener al VAA en forma monomérica [109]. Sin embargo, la cantidad de luz dispersada en esta muestra (2,703 kcps) fue menor a lo esperado ($\cong 4500$). El que la cantidad de luz dispersada fuese menor a lo esperado sugiere que ocurrió pérdida de las PPV-VAA durante la concentración y diafiltración, probablemente porque la solución favoreció la interacción de las PPV-VAA con el dispositivo de ultrafiltración. Xie y colaboradores reportaron un problema similar durante la concentración del VAA silvestre [107]. La adición de glicerol a una concentración de 25% les permitió evitar la interacción del virus con las membranas de ultrafiltración. Desafortunadamente, la elevada viscosidad que presentan las soluciones con glicerol a esta concentración es incompatible con los análisis de dispersión dinámica de luz que utilizamos como parte de la estrategia de caracterización de las PPV-VAA

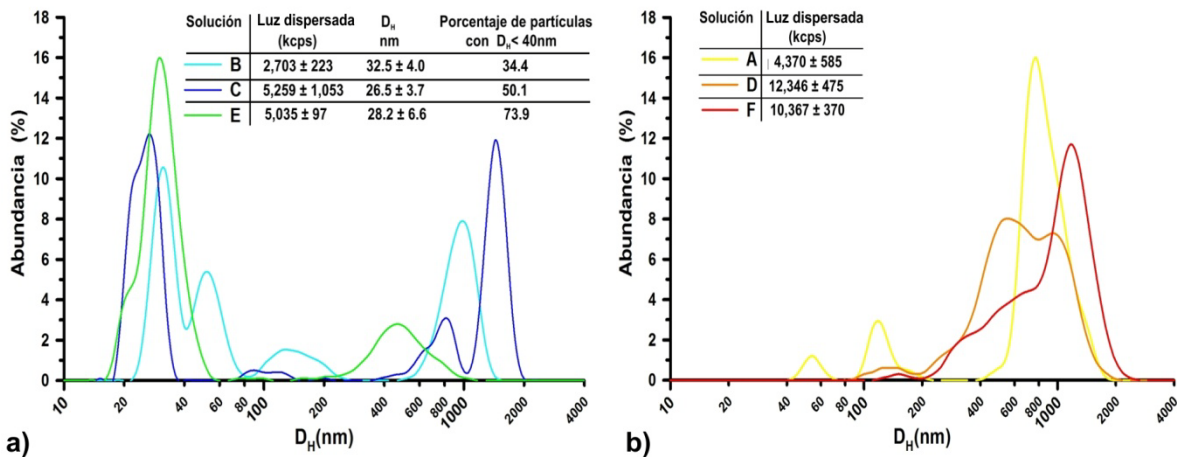


Figura 34.- Distribuciones de tamaño de muestras de PPV-VAA diafiltradas y concentradas 10 veces. (a) Soluciones cuya distribución de tamaño presento partículas con $D_H < 40$ nm. (b) Soluciones con distribuciones de tamaño sin partículas con $D_H < 40$ nm. El D_H reportado en las tablas es el promedio de la población más pequeña detectada en las muestras.

En las muestras diafiltradas con soluciones del segundo grupo se observó una diferencia en la intensidad de luz dispersada, dependiente de la fuerza iónica de la solución. Para estas muestras se esperaba obtener cantidades de luz dispersada de más del doble del valor teórico ($\cong 4500$ kcps), resultado de la presencia de agregados en las muestras. Sin embargo, las muestras diafiltradas en solución A (H_2O con fuerza iónica igual a 0) mostraron una intensidad de luz dispersada inusualmente baja si tomamos en cuenta que el 75% de las partículas tenían un D_H mayor a 650nm. Este comportamiento sugiere que, además de la agregación de PPV, se presentó pérdida de las mismas probablemente por interacción con la membrana del dispositivo de ultrafiltración. En contraste, las soluciones D y F sólo presentaron poblaciones con D_H promedio mayor a 500 nm y cantidades de luz dispersada de entre 2.5 y 3 veces el valor esperado. Esto sugiere que no hubo pérdidas durante la concentración, aunque evidentemente estas soluciones no evitaron la agregación de las PPV-VAA.

Acorde a los resultados, cabe suponer que el incremento de la fuerza iónica en la solución de diafiltración disminuyó el grado de interacción de las PPV-VAA con la membrana del dispositivo de ultrafiltración. Esta suposición surge a partir de observar que las muestras concentradas en las soluciones A y B (fuerza iónica menor a 200 mM) presentaron una intensidad de luz dispersada menor a la que cabría esperar a partir de la

distribución de tamaño de partícula que exhibieron. Los resultados obtenidos concuerdan parcialmente con lo mencionado en la literatura. Por ejemplo, Wright y colaboradores reportaron que a pH por arriba de 7.0, las PPV-VAA no se agregan y mantienen un D_H promedio menor a 40 nm siempre y cuando la fuerza iónica sea mayor a 200 mM, independientemente de la sal utilizada [109]. Sin embargo, cuatro de nuestras seis soluciones tenían fuerzas iónicas superiores a 200mM y sólo dos fueron capaces de prevenir la agregación. Por otro lado, la solución que el mismo trabajo propone como la más eficiente para almacenar las PPV-VAA (citrato 100mM-Tris 10mM pH 8.0) también resultó ser la mejor en nuestros experimentos.

Es importante mencionar que los reportes de la literatura orientados a prevenir la agregación del VAA en solución se han realizado con virus recombinantes, los cuales contienen material genético, a diferencia de las PPV-VAA que nosotros analizamos. La presencia de material genético al interior de las cápside ocasiona un cambio en el punto isoeléctrico de las partículas que si bien aún no ha sido numéricamente evaluado, si ha sido demostrado ya que es posible separar la cápsides de VAA llenas (de material genético) de las vacías mediante cromatografía de intercambio aniónico [96]. Esta diferencia en puntos isoeléctricos entre partículas llenas y vacías podría ser una explicación para la falta de concordancia entre nuestros resultados y los de otros autores.

6.6.2 Efecto de la temperatura sobre el tamaño de las PPV-VAA

Como primer abordaje se investigó el cambio en la distribución de tamaño de partícula mediante DLS en el intervalo de temperatura entre 25 y 75°C con mediciones únicas cada 5°C y un tiempo de incubación de 10 minutos a cada temperatura. Se midió: la intensidad de luz dispersada y el D_H promedio de las partículas.

Entre los 25 y 65°C no se observaron cambios sobre ninguna de las variables. A partir de los 70°C no se detectaron partículas con D_H menor a 40 nm y se presentó un abrupto incremento en la cantidad de luz dispersada (**Figura 35-a**). El cambio en la distribución de tamaño de partícula de la muestra producto del calentamiento hasta 75°C es un proceso no reversible, ya que al final del experimento se disminuyó la temperatura de la muestra a 25°C y se dejó incubar por 60 minutos para posteriormente determinar la distribución de tamaño de partícula. Esta nueva distribución (25°C-final) fue similar a la observada a 75°C. Se observó una población de partículas única con un tamaño promedio de 2000 nm, pero

con una dispersión menor a la que se observó en la muestra a 75°C. También se observó que la muestra original (25°C inicial) presentó, además de la población de 25 nm, una con D_H promedio cercano al encontrado a 75°C, esto sugiere que originalmente la muestra contenía una pequeña fracción PPV-VAA agregadas (**Figura 35-b**).

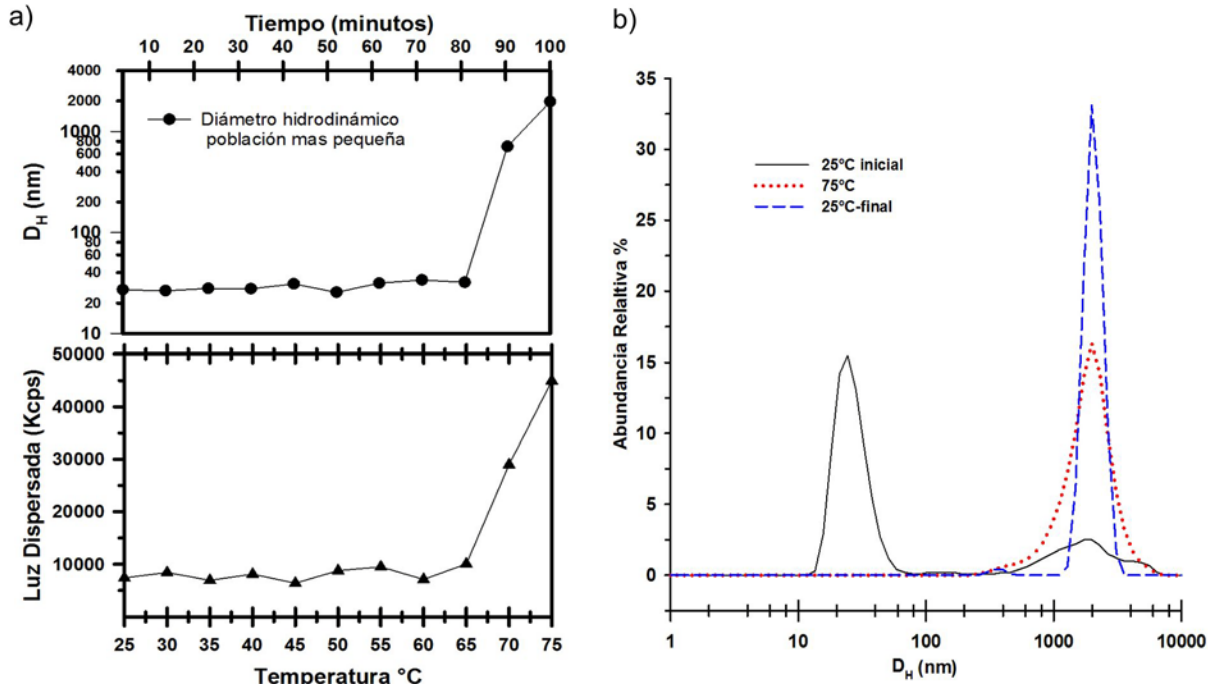


Figura 35.- Análisis preliminar del efecto de la temperatura sobre el tamaño de PPV-VAA a) Cambios en la intensidad de luz dispersada (panel inferior) y tamaño de partícula (panel superior) de PPV-VAA producto de su incubación a diferentes temperaturas. Se indican la temperatura de incubación y el tiempo transcurrido durante el ensayo. B) Distribuciones de tamaño de partícula a las condiciones iniciales (25°C), finales (75°C) y a temperatura ambiente 60 minutos después de terminado el ensayo (25°C final).

Se analizó mediante Slot-blot la muestra de PPV-VAA sometida al proceso de calentamiento gradual, así como una muestra no sometida al proceso de calentamiento. Los resultados indican que el calentamiento hasta 75°C ocasionó una pérdida de afinidad del anticuerpo A20 por la proteína viral (**Figura 36**). Dicha pérdida es resultado de la desaparición del epítipo conformacional reconocido por el anticuerpo. La desaparición del epítipo indica que la cápside ha perdido su estructura tridimensional, lo que se traduce en el desensamblaje de la PPV.

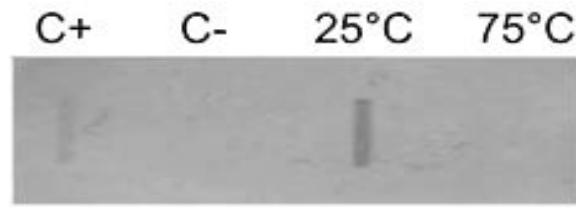


Figura 36.- Inmunodetección de PPV-VAA completas con el anticuerpo A20.

Durante este ensayo se observó que el incremento de la temperatura de incubación desde 25 hasta 60° y 65°C ocasionó desplazamientos hacia la derecha en la distribución de tamaño de partícula de la primera población, así como la aparición de una segunda población de partículas con D_H promedio de 200 nm (no se muestran los datos). Esto nos motivó a realizar un nuevo barrido de temperatura incrementando los tiempos de incubación y el número de mediciones, con la finalidad de identificar con mayor precisión la temperatura a la cual se presenta un cambio significativo en el D_H de las PPV-VAA.

Las muestras se calentaron desde 25°C hasta 65°C y a partir de los 45°C se hicieron mediciones de tamaño cada 2°C. Para este experimento se incrementó el tiempo de incubación en cada temperatura de 10 a 35 minutos y se hicieron 6 mediciones de tamaño de partícula por temperatura. El ensayo se realizó por triplicado para dos muestras de PPV-VAA distintas, la muestra A con 2.8×10^{12} cápsides/ml purificadas en nuestro laboratorio por intercambio aniónico-gradientes isopícnicos en iodixanol y la muestra B, con 1.5×10^{12} cápsides/ml purificadas por intercambio catiónico-interacción hidrofóbica, las cuales fueron donadas por el Dr Amine Kamen (Biotechnology Research Institute, Montreal, Canadá).

En la **figura 37** se presentan los resultados de este segundo experimento. La cantidad de luz dispersada por la muestra A (3750 kcps) fue mayor que la de la muestra B (752 kcps), producto de las diferencias de concentración entre ambas muestras. Los tamaños de partícula iniciales fueron ligeramente diferentes entre ambas muestras pero se encuentran dentro del rango esperado. La temperatura a partir de la cual se observó un incremento en el D_H promedio (temperatura crítica) fue diferente para la muestra A (61°C) y para la muestra B (63°C). La cantidad de luz dispersada de ambas muestras también se incrementó producto del cambio de temperatura. Sin embargo el incremento fue diferente ente ambas muestras, ya que para la muestra A se presentó desde los 55°C, mientras que para la muestra B se presentó a los 63°C, es decir en este último caso los cambios tanto en el D_H promedio como en la cantidad de luz dispersada se presentaron a la misma temperatura. El

hecho de que la agregación o el incremento en la cantidad de luz dispersada se presentara en la muestra A antes que en la muestra B lo atribuimos al mayor porcentaje de partículas con $D_H > 40$ nm (agregados) que presentaba la muestra A (35%) desde el inicio del ensayo, comparado con el de la muestra B (15%). La pureza de ambas muestras era similar, según se constató mediante tinción con plata de un gel de poliacrilamida (**Anexo D**).

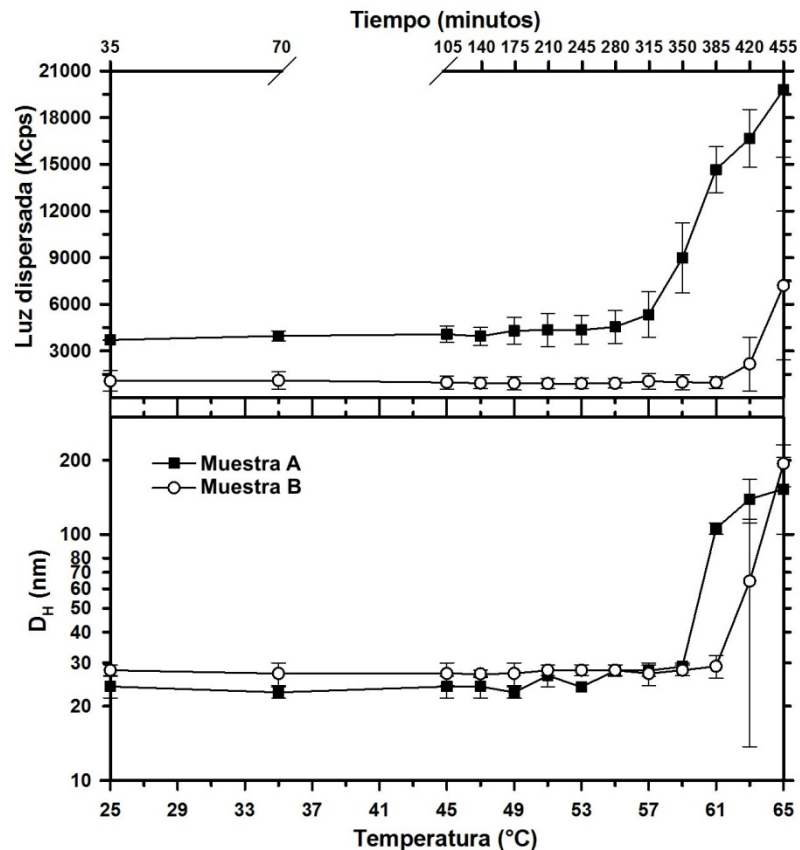


Figura 37.- Cambios en la intensidad de luz dispersada (panel inferior) y tamaño de partícula (parte superior) de dos muestras de PPV-VAA en función de la temperatura. Las barras de error indican la desviación estándar de las tres mediciones realizadas.

En la **figura 38** se muestra la distribución de tamaño de partícula para las muestras A y B a 4 temperaturas diferentes: condición inicial, los dos puntos anteriores a la temperatura crítica y el de la temperatura crítica. A pesar de que las temperaturas críticas son diferentes, se observó que para ambas muestras las distribuciones de tamaño de partícula fueron similares una vez que se presentó el fenómeno de agregación. En la muestra B se observó un incremento en el D_H promedio de la población uno a los 61°C, temperatura a la cual aun no se detectaron agregados, En la muestra A no se observaron cambios en el D_H promedio

de la población más pequeña hasta los 59°C y fue imposible determinar si el mismo ocurrió a los 61°C, ya que a esta temperatura todas las PPV-VAA ya habían formado agregados.

Con estos resultados supusimos que el ligero cambio en el D_H a los 61°C podía ser reflejo del cambio de conformación que la cápside sufre al exponer el dominio amino terminal de la proteína VP1, fenómeno previamente reportado para el VAA silvestre.[34].

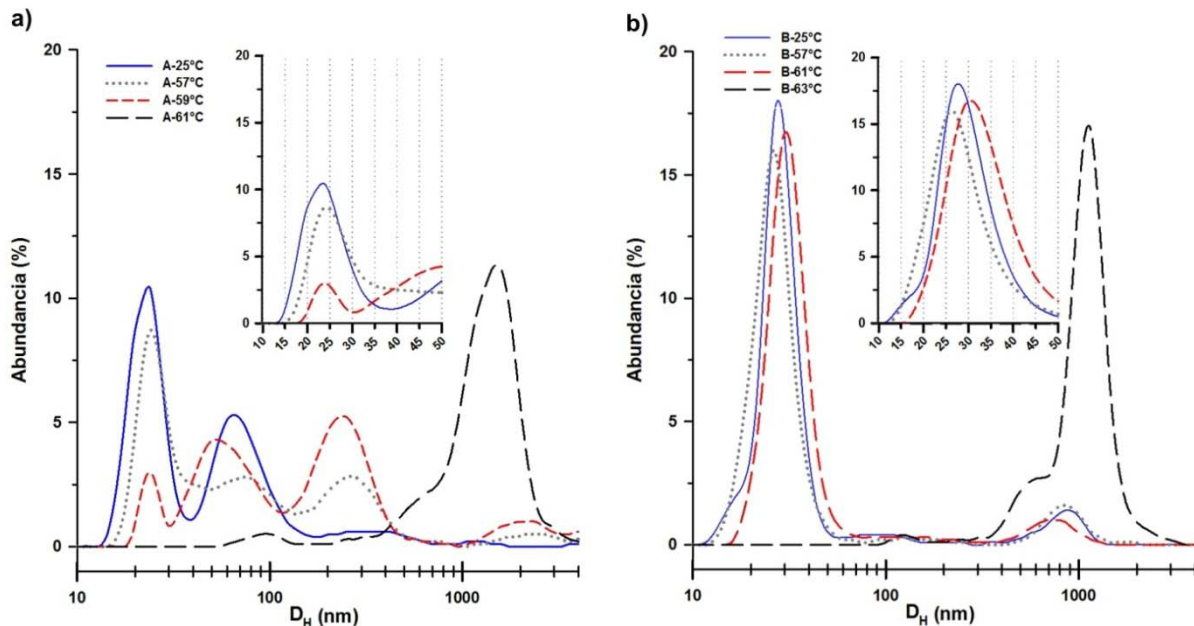


Figura 38.- Distribución de tamaño de partícula en muestras de PPV-VAA a diferentes temperaturas. a) Muestra A de PPV-VAA b) Muestra B de PPV-VAA

Para verificar si las cápsides expusieron el dominio amino terminal de la proteína VP1, producto de la incubación a diferentes temperaturas, se procedió a hacer la inmunodetección mediante Dot-blot usando el anticuerpo A1, que reconoce el extremo amino terminal de VP1. Se incubaron alícuotas de 100 μ l de las muestras A y B a 3 temperaturas diferentes: 25°C, 61°C y 65°C. Las alícuotas se dividieron en dos y fueron procesadas como se describe en materiales y métodos para el ensayo de Dot-blot en dos membranas diferentes. Una membrana fue tratada con el anticuerpo A20 (cápsides completas) y otra con el anticuerpo A1.

Los resultados del Dot-blot (**Figura 39-a**) indican que a 25°C las muestras contenían partículas pseudovirales que no tenían expuesto el extremo amino terminal de VP1. A 61°C (justo antes de la temperatura crítica), las muestras fueron positivas para PPV-VAA y a VP1. Esto indica que aún se conserva la estructura de la cápside y que además el extremo

amino terminal está disponible para ser reconocido por el anticuerpo, ya sea producto del desensamblaje de algunas de las cápsides presentes en la muestra o debido a la salida de este dominio proteico a través de los poros en los ejes de simetría pentaxial de la cápside viral como ha sido reportado previamente [34]. A 65°C no fue posible detectar cápsides y la intensidad de la señal de VP1 incrementó con respecto a los 61°C, lo cual confirma que la incubación a esta temperatura ocasionó el desensamblaje de todas las cápsides. Las **figuras 37 b y c** son micrografías electrónicas de muestras incubadas a 25°C y 61°C, respectivamente.

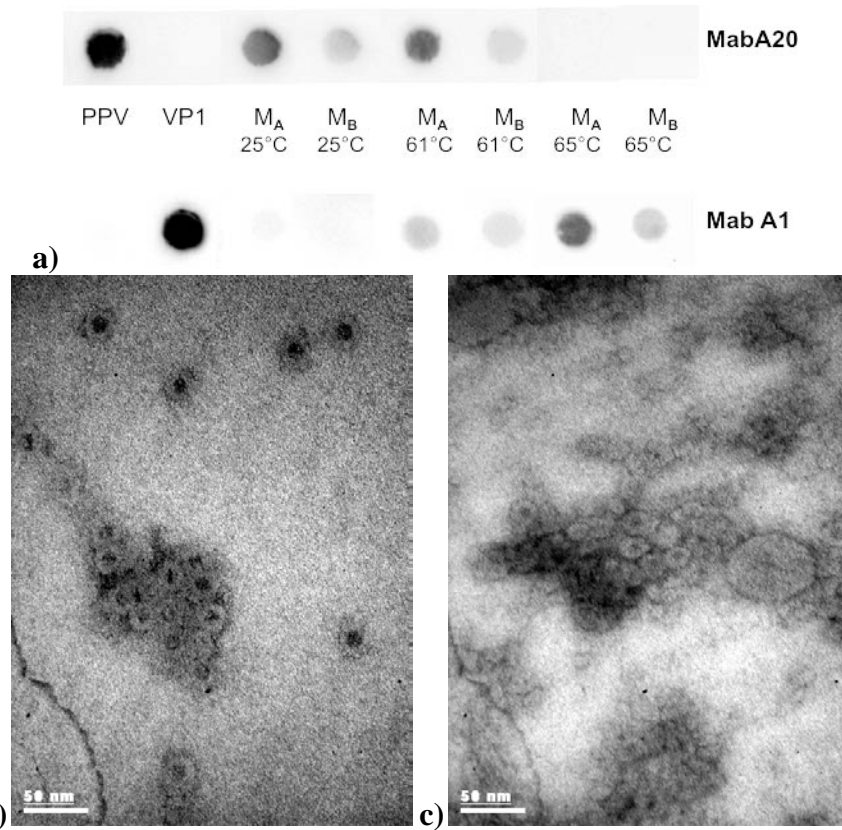


Figura 39.- a) Ensayo de Dot-blot para detectar cápsides (Mab A20) y el extremo amino terminal de VP1 (Mab A1) en muestras incubadas a diferentes temperaturas. b) Micrografía electrónica de una muestra de PPV incubada a 25°C. c) Micrografía electrónica de una muestra de PPV incubada a 61°C.

Los dos experimentos anteriores mostraron que existe una temperatura crítica (63°C) en la que las proteínas y/o las cápsides de VAA comienzan a agregarse. Sin embargo, el enfoque empleado no permite definir si la agregación se presentó inmediatamente después de la exposición a 63°C o fue resultado de la exposición prolongada a temperaturas por debajo de la temperatura crítica. Con el fin de esclarecer esta duda, alícuotas de 50 µl de una muestra con PPV se mantuvieron en incubación a 61°C. A lo largo del periodo de

incubación se hicieron determinaciones de tamaño de partícula y se tomaron como variables a medir la cantidad de luz dispersada, el porcentaje de partículas con $D_H < 40\text{nm}$ y el D_H promedio. Los resultados se muestran en la **figura 40**.

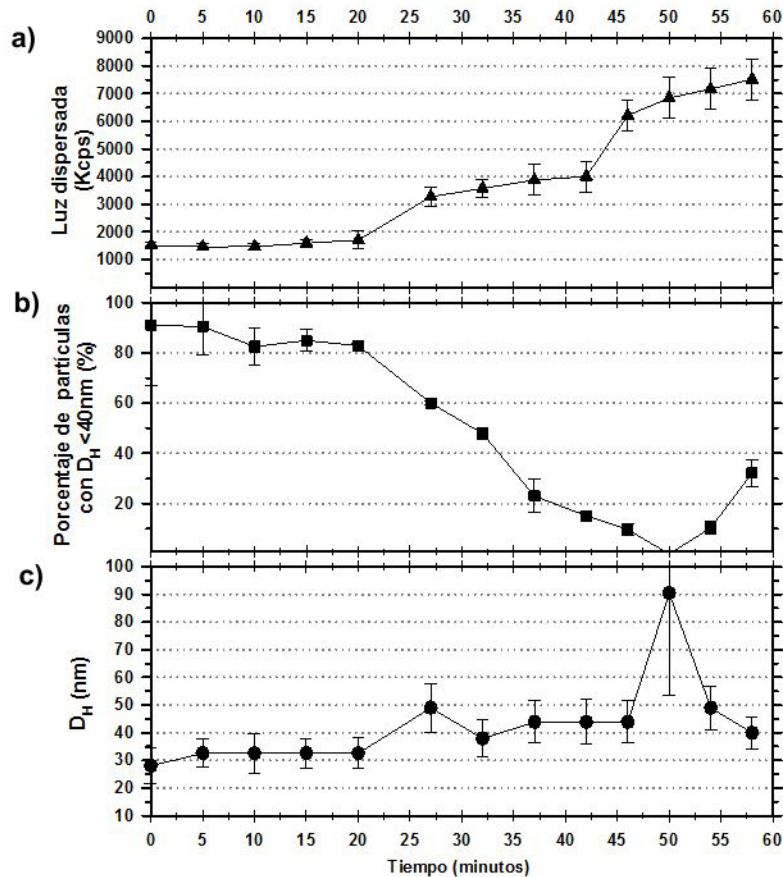


Figura 40.- Análisis mediante DLS de muestras incubadas a 61°C . a) Cantidad de luz dispersada, b) porcentaje de partículas con $D_H < 40\text{nm}$ c) D_H promedio de PPV-VAA.. Las barras de error indican la desviación estándar de las mediciones que se hicieron por triplicado.

Desde el inicio del experimento y hasta los 20 minutos, la cantidad de luz dispersada se mantuvo constante. A partir de entonces y hasta el final del ensayo se presentó un incremento en la cantidad de luz dispersada que estuvo acompañado por una constante disminución del porcentaje de partículas con D_H menor a 40 nm, el cual llegó a cero a los 50 minutos de calentamiento (**Figura 40 a y b**). El D_H inicial (25°C) fue de 28 nm. Tras iniciar el calentamiento, el D_H incrementó hasta los 32 nm y se mantuvo constante hasta los 20 minutos, al igual que el porcentaje de partículas menores a 40 nm, que fue el 95%. El D_H promedio incrementó nuevamente a partir de los 20 minutos alcanzando valores de alrededor de 45nm durante el resto del experimento, salvo a los 50 minutos en donde la población de partículas más pequeñas presentó un diámetro hidrodinámico de 90 nm

(Figura 40-c). Desde el tiempo en el que disminuyó el porcentaje de partículas con D_H menor a 40 nm se observó la aparición de una segunda población de partículas con D_H promedio de 200 nm (no se muestran los datos).

Con el objetivo de determinar si los cambios en el tamaño y la abundancia relativa de las PPV-VAA tras la incubación por un periodo prolongado de tiempo a 61°C eran reversibles se procedió de la siguiente manera: al finalizar la incubación 61°C, el equipo se programó para disminuir la temperatura de la muestra desde 61°C hasta 15°C con mediciones de tamaño cada 3°C. El tiempo de incubación para cada temperatura fue de aproximadamente 12 minutos y se hicieron 6 mediciones de tamaño de partícula por temperatura..

Encontramos que el proceso de agregación no fue reversible, ya que no fue posible detectar partículas con D_H menor a 40 nm durante o después del enfriamiento. En la **figura 41** se muestran los D_H promedio de las poblaciones más pequeñas detectada a cada temperatura, cuyos valores oscilaron entre 80 y 200 nm, tamaño similar a la población que apareció al final del periodo de incubación a 61°C. La abundancia de la población con D_H entre 80 y 200 nm disminuyó a lo largo del proceso de enfriamiento a expensas del incremento en la abundancia de otra población con un D_H de alrededor de 1000 nm.

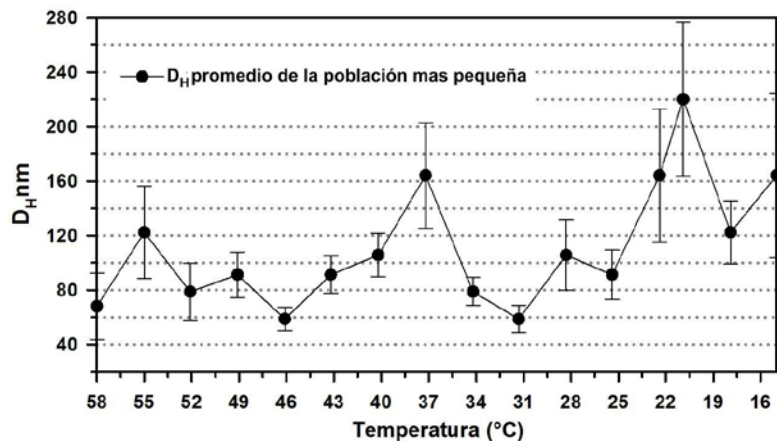


Figura 41.- Tamaño de partícula de la población más pequeña detectada durante el enfriamiento de muestras de PPV-VAA post incubación a 61°C. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados

Una vez que determinamos que la exposición de las PPV-VAA a una temperatura de 61°C por 45 minutos resultó en su agregación, decidimos a evaluar la estabilidad de las partículas frente a temperaturas ligeramente inferiores a la temperatura crítica. Para este fin las PPV-VAA se sometieron a un proceso en el que se alternó varias veces la temperatura de incubación entre 25°C y temperaturas subcríticas (57 y 59°C). El objetivo del

experimento fue identificar si la exposición a temperaturas subcríticas en más de una ocasión provoca cambios conformacionales en las PPV-VAA o la agregación de las mismas.

El proceso de incubación consistió en cinco etapas de 35 minutos cada una, en las que se mantuvo constante la temperatura. Las temperaturas de cada etapa fueron; 25, 57, 25, 59 y 25°C. Los cambios de temperatura entre una y otra etapa se hicieron en aproximadamente 2 minutos. El ensayo se hizo por triplicado y se realizaron ocho mediciones por cada etapa. Se utilizaron como criterios de evaluación: la intensidad de luz dispersada, el D_H promedio, el D_H modal y el porcentaje de partículas con $D_H < 40\text{nm}$.

Se observó un incremento en la cantidad de luz dispersada hacia la mitad del ensayo. Dicho aumento fue aproximadamente del 30% y revirtió a sus valores originales durante la quinta etapa (**Figura 42-a**). El análisis de varianza confirmó que existieron diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de luz dispersada entre las etapas del proceso y mediante una prueba de comparación múltiple (método de Holm-Sidak) se identificó a la tercera y cuarta etapa como las estadísticamente diferentes. También hacia la mitad del proceso se observó un cambio en el porcentaje de partículas con $D_H < 40\text{ nm}$, ya que al pasar de 25 a 59°C este porcentaje disminuyó de 76 a 68%, sin embargo durante la quinta etapa, al regresar a 25°C, la abundancia de esta población se elevó de nueva cuenta a 76% (**Figura 42-b**). El análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples indicó que solo se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores registrados durante la cuarta etapa (59°C) y las etapas; inmediata anterior (25°C) y la etapa final (25°C final).

A diferencia de lo observado con la cantidad de luz dispersada o el porcentaje de partículas con $D_H < 40\text{ nm}$, el D_H promedio y el D_H modal de las partículas no presentaron cambios estadísticamente significativos durante el ensayo. La pequeña diferencia, de alrededor de un nanómetro, entre los diámetros promedio y modal a los 59°C y 25°C final (**Figura 42-c**) se debió a un pequeño aumento en la dispersión de tamaño de las PPV-VAA y no un incremento de tamaño. Los fenómenos de disminución en el porcentaje de partículas de $D_H < 40\text{nm}$ y la diferencia entre D_H promedio y modal puede ser consecuencia de la agregación temporal de las PPV-VAA a 59°C, producto de un mayor número de colisiones entre partículas. Por otro lado, el comportamiento exhibido durante el

experimento con respecto al incremento en la intensidad de luz dispersada es inesperado, ya que como se explicó previamente, la luz dispersada es proporcional a la concentración de la muestra y al tamaño de las partículas presentes y no se observó un incremento en el tamaño de partícula o una disminución en la abundancia relativa en el punto donde se presentó el aumento en la intensidad de luz dispersada (25°C).

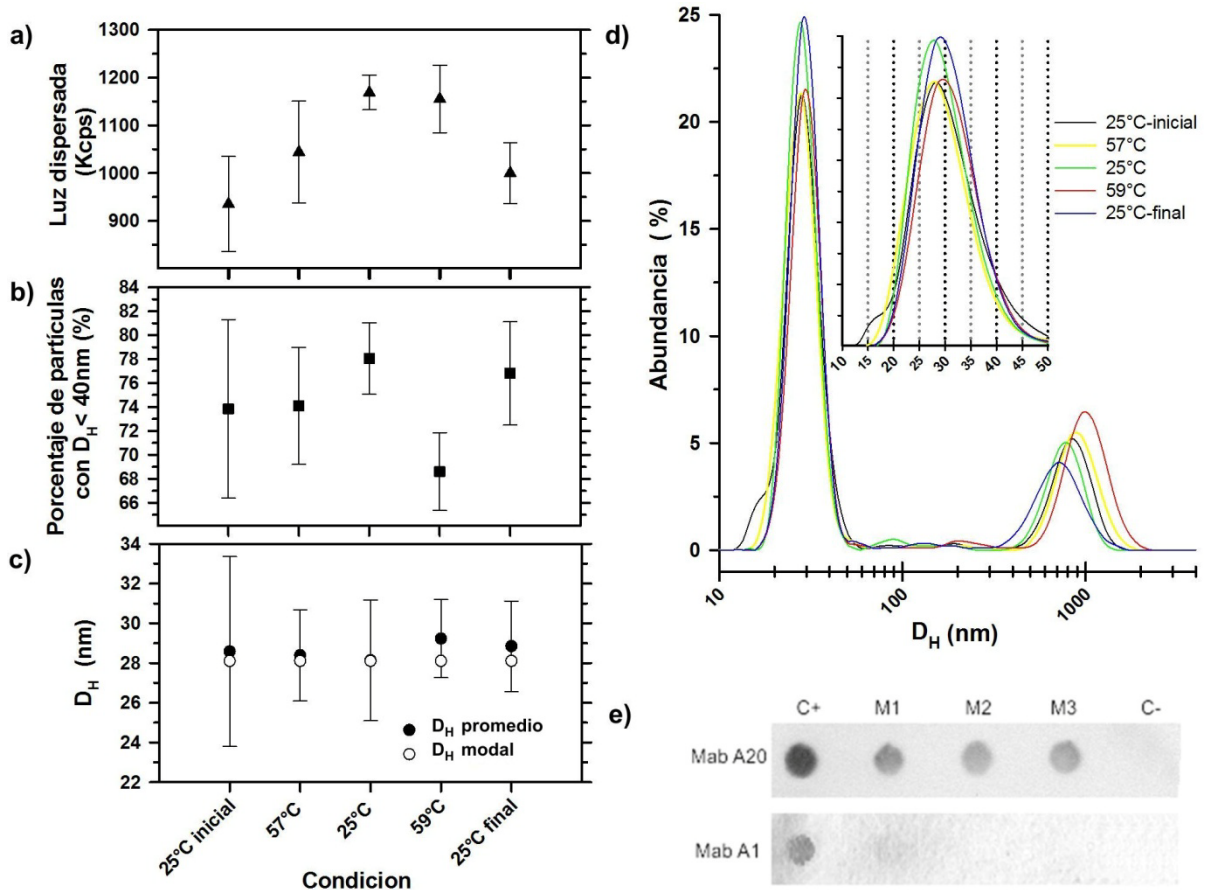


Figura 42.- Resultado de la exposición de PPV-VAA a oscilaciones de temperaturas a) Cantidad de luz dispersada (panel superior), porcentaje de partículas con $D_H < 40\text{nm}$ (panel central), diámetro hidrodinámico promedio y modal (panel inferior) b) Distribución de tamaño de partículas. C) Dot blot contra cápsides intactas (Mab-A20) y extremo amino terminal de VP1 (Mab-A1) de muestras con PPV-VAA. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados

En la **figura 42-d** se presenta la distribución de tamaño de partícula obtenida para las cinco etapas del experimento. A todas las temperaturas se observó la misma distribución, lo que indica que bajo las condiciones ensayadas no se presentó el cambio conformacional que se identificó previamente cuando las cápsides se calentaron hasta 61°C. Para confirmar la integridad de las cápsides e identificar si se expuso el extremo amino terminal de VP1 tras el calentamiento a 59°C, se hizo un Dot-blot con los anticuerpos A20 y A1. El

resultado se muestra en la **figura 42-e**. Para las tres muestras analizadas fue posible detectar cápsides intactas y en ningún caso se detectó el extremo amino terminal, lo que confirma que a 59°C no se presenta el cambio conformacional que permite la exposición del extremo amino terminal de VP1 observado a 61°C.

Bleaker y colaboradores [110] midieron la actividad fosfolipasa así como la exposición del amino terminal de VP1 en VAA silvestres tras su incubación por 30 minutos a distintas temperaturas. Ellos encontraron que tras incubar a 60°C es posible detectar tanto la actividad fosfolipasa como el epítrope del extremo amino terminal y que el incremento de la temperatura de incubación hasta 65°C permite aumentar la respuesta en ambos ensayos sin que se observe una disminución en la cantidad de cápsides intactas. La incubación a una temperatura más alta (75°C) ocasionó la pérdida de la actividad fosfolipasa y de la respuesta contra el anticuerpo A20, que reconoce cápsides intactas, debido a la desnaturalización de las proteínas virales [110]. Por su cuenta, Kronenberg y colaboradores mostraron en estudios mediante microscopia electrónica e inmunodetecciones que este comportamiento solo sucede en cápside que contienen material genético en su interior y no en PPV vacías [34]. En un estudio reciente realizado por Gerlach y colaboradores se identificó que el VAA tipo 1 exhibe un comportamiento similar al VAA tipo 2 frente a su incubación a diferentes temperaturas salvo que la exposición del amino terminal se presenta desde los 57°C y el virus mantiene su integridad estructural aun después de haber sido incubado a 72°C [111].

En contraste con lo reportado por Kronenberg, en este trabajo se encontró que el fenómeno de exposición del extremo amino terminal de la proteína VP1 si sucede en PPV-VAA que no tienen material genético. La exposición del extremo amino terminal en PPV-VAA vacías fue detectada a los 61°C y estuvo acompañada por un incremento cercano a 3nm en el D_H promedio de las PPV-VAA y por un cambio en el espectro de absorción de las partículas (**Anexo E**). A diferencia de lo encontrado por Bleaker y colaboradores, en nuestro caso no fue posible detectar PPV-VAA en muestras calentadas a 65°C, ya fuese por inmunodetección con el anticuerpo A20 o mediante microscopia electrónica. Y tampoco fue posible identificar poblaciones de partículas con un D_H similar al del VAA cuando las muestras alcanzaron los 65°C.

Con base en los resultados obtenidos, concluimos que las PPV-VAA son capaces de resistir temperaturas de 59°C hasta por una hora sin que se presenten cambios conformacionales. Entre 59 y 61°C sucede un cambio conformacional de la cápside que permite la salida del extremo amino terminal a través de los ejes de simetría pentaxial y que dependiendo del tiempo de permanencia en estas temperaturas se puede presentar la agregación irreversible de las PPV-VAA. Además, la temperatura de desnaturalización de las PPV-VAA es al menos 10°C menor a la reportada para el VAA silvestre.

Los resultados obtenidos nos permitieron proponer una estrategia de encapsidación de fluoresceína (sección 6.7) tomando ventaja del cambio conformacional que se presentó a 61°C el cual involucra a los poros presentes en los ejes de simetría pentaxiales.

6.6.3 Efecto de la temperatura de incubación sobre el potencial zeta (ζ) de las PPV-VAA.

El efecto de la temperatura sobre el tamaño de las PPV-VAA indicó que el calentamiento provocó un ligero incremento de tamaño acompañado por la exposición del extremo amino terminal de la proteína VP1. Ambos fenómenos precedieron la agregación irreversible que se observó por encima de los 61°C. Estos cambios motivaron el diseño de un experimento cuyo objetivo fue identificar cambios en el ζ producto del calentamiento, ya que la exposición del amino terminal en la superficie de las PPV-VAA podría ocasionar una disminución en la carga eléctrica de la superficie, lo cual disminuiría la energía de repulsión entre partículas y resultaría en su agregación.

Se hizo un barrido de temperaturas desde 25°C hasta 65°C con determinación de ζ cada 2°C y 4 mediciones por temperatura. El ensayo se realizó por triplicado con PPV-VAA en una solución amortiguadora de citratos 100 mM Tris 10mM pH 8.0. De estas muestras, 125 μ l fueron diluidos 1 a 8 en H₂O destilada (filtrada por membrana de PVDF con 0.1 μ m de diámetro de poro) antes del ensayo para evitar daños sobre los electrodos de la celda debido a la alta concentración de sales en las muestras.

La conductividad incrementó con respecto a la temperatura, lo cual es el comportamiento esperado y sirve para descartar problemas como la evaporación del solvente o la precipitación de sales producto de la corriente eléctrica aplicada (**Figura 43-a**). El ζ de las

PPV-VAA no fue diferente a lo largo del experimento. Los valores promedio oscilaron, entre -25.2 y -29.2 mV. Sin embargo, se observó que a partir de los 45°C incremento considerablemente la desviación estándar, probablemente debido al daño generado sobre los electrodos de la celda producto de mediciones repetidas. (Figura 43-b). Este fenómeno pudo haber ocultado los cambios de ζ sufridos por las partículas

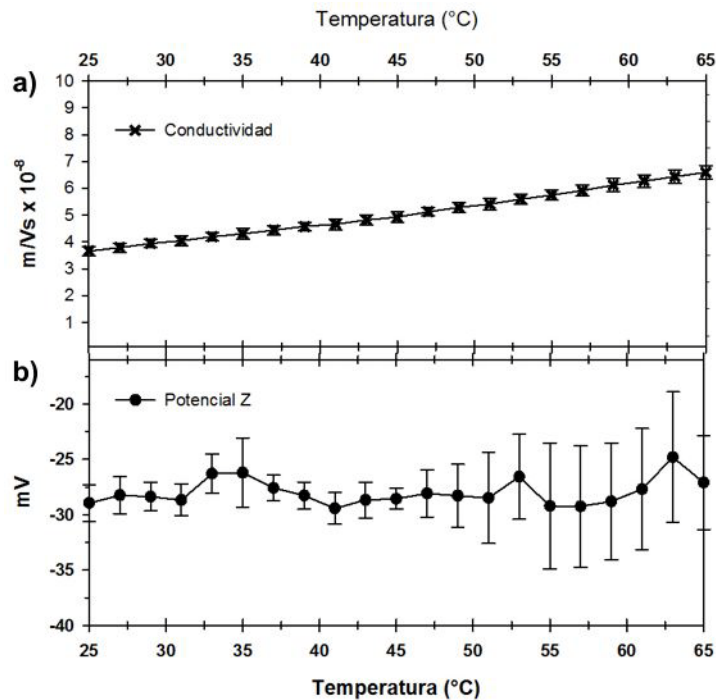


Figura 43.- a) Conductividad y b) potencial Z de muestras con PPV-VAA a diferentes temperaturas. Las barras de error indican la desviación estándar de las mediciones hechas por triplicado.

Se hizo un segundo experimento en el rango de temperatura entre 45 y 65°C con los mismos parámetros de medición, con el objetivo de obtener el potencial Z en este intervalo y descartar el “ruido” generado por el daño sobre los electrodos de la celda. En la figura 44 se presenta el ζ en el rango de 45 - 65°C obtenido en este segundo experimento (cuadros) acompañados de los datos entre 25 y 43°C obtenidos en el primer experimento (círculos). En esta grafica se puede observar que las desviaciones estándar fueron similares en todas las temperaturas, lo cual parece indicar que la suposición hecha con respecto al daño sobre los electrodos de la celda tras un cierto número de mediciones es correcta. Por otra parte, aunque no se observaron grandes cambios en el valor de ζ a lo largo del intervalo de

temperatura, la prueba de producto momento de Pearson arrojó un nivel bajo de correlación $\rho_P = -0.235$ ($p = 0.007$ y potencia de 76%).

La exposición del extremo amino terminal de la proteína VP1 a la temperatura crítica no ocasionó un cambio significativo en el ζ tal y como esperábamos. Suponemos que este cambio no se presentó debido a que la presencia de este fragmento de proteína en la superficie de la partícula no afecta significativamente la carga superficial de la PPV-VAA. Es posible que la correlación encontrada entre ζ y la temperatura sea producto de cambios en la constante de protonación de las cadenas laterales de los aminoácidos responsables de la carga superficial de las PPV-VAA. La disminución en la constante de protonación de los aminoácidos básicos producto del incremento de la temperatura ya ha sido reportada [112]. Mediante los experimentos propuestos en este trabajo no fue posible determinar cuál es el impacto de este cambio de ζ en relación a la estabilidad de las PPV-VAA o los cambios de conformación observados.

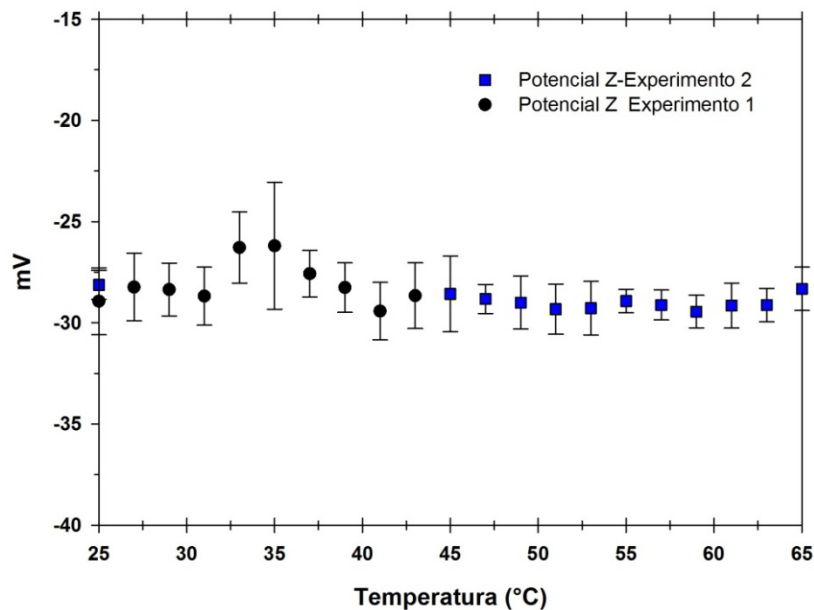


Figura 44.- Efecto de la temperatura sobre el ζ obtenido en dos experimentos diferentes. Los círculos corresponden a los valores de ζ obtenidos al elevar la temperatura de la muestra desde 25°C hasta 45° con mediciones cada 2°C (primer experimento). Los cuadros representan los valores obtenidos al elevar la temperatura rápidamente desde 25 hasta 45°C y posteriormente elevarla lentamente hasta 65°C con mediciones cada 2°C (segundo experimento). Las barras de error indican la desviación estándar de las mediciones hechas por triplicado.

6.6.4 Efecto del pH sobre la estructura de las PPV-VAA

Se diseñó un experimento con la finalidad de determinar si el pH ocasiona cambios estructurales en las PPV-VAA. Se tomaron alícuotas de 200 μ l de PPV-VAA y se diluyeron hasta 300 μ l con solución amortiguadora de citratos 100 mM-Tris 10 mM pH 8.0. Las muestras se colocaron en tubos de polipropileno de 1.5 ml con fondo plano y se sonicaron por tres ciclos, tal y como se describe en materiales y métodos. Cada muestra (un total de tres) se sometió a un proceso de titulación en el que el pH se llevó desde 8.0 hasta 4.5 con puntos intermedios cada 0.5 unidades y un margen de error de ± 0.1 . El pH de las muestras se monitoreó continuamente y bajo agitación constante mediante un micoelectrodo (Acumet –Cole Palmer). La titulación se hizo mediante la adición de HCl 250 mM y NaOH 100 mM. Para cada pH se hicieron 6 determinaciones de tamaño de partícula, 3 mediciones del espectro de fluorescencia y se prepararon rejillas para su observación por microscopía electrónica de transmisión.

Durante el proceso de titulación se observó una disminución progresiva en el porcentaje de partículas con D_H menor a 40 nm desde 94% hasta 77 % (**Figura 45-a**) a expensas de la aparición de una nueva población de partículas con D_H promedio de 800 nm (no se muestran los datos). Cabe hacer notar que el cambio de pH ocasionó también un aumento en la desviación estándar del porcentaje de partículas con D_H menor a 40nm (barras de error figura 45-a). De igual manera, durante el proceso de titulación se observó un incremento en la cantidad de luz dispersada. Dicho incremento se presentó durante el cambio desde pH 8.0 hasta pH 6.5 punto a partir del cual no se observó una tendencia en los sucesivos cambios de luz dispersada en función del pH de la muestra (**Figura 45-b**). Tanto el incremento en la luz dispersada como la disminución en el porcentaje de partículas con D_H menor a 40nm son resultado de la aparición de partículas grandes en las muestras. Con base en las tendencias observadas y en que en las rejillas utilizadas para microscopía electrónica no se encontraron agregados, suponemos que las partículas grandes no se formaron por la agregación de las PPV-VAA, sino que son partículas que se introdujeron en las muestras producto de la manipulación de las mismas durante la adición de las soluciones tituladoras o durante el transpaso de las muestras entre los tubos de polipropileno y las celdas para la medición de fluorescencia y dispersión dinámica de luz.

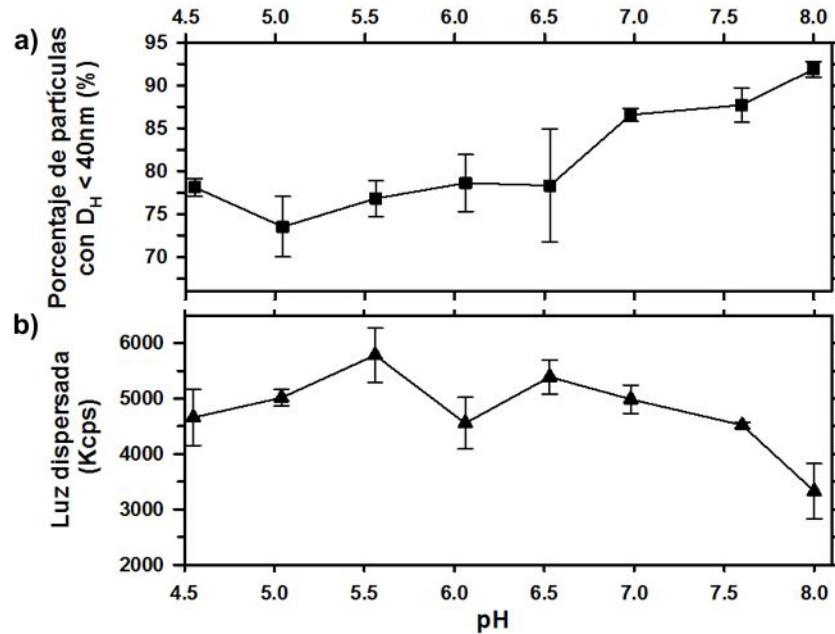


Figura 45.-Análisis mediante DLS de PPV-VAA a diferentes valores de pH a) Porcentaje de partículas con D_H menor a 40 nm en muestras de PPV-VAA a diferentes valores de pH. b) Cantidad de luz dispersada por muestras de PPV-VAA a diferentes pH durante el ensayo de titulación. Se presentan el promedio y la desviación estándar de tres ensayos independientes.

En la **figura 46-a** se muestran los D_H promedio y modales obtenidos mediante dispersión dinámica de luz así como el diámetro promedio obtenido mediante la medición de las PPV-VAA en imágenes de microscopía electrónica de transmisión (TEM). Las diferencias de tamaño obtenidas entre dispersión dinámica de luz y TEM ($\cong 4\text{ nm}$), pueden ser consecuencia del encogimiento de las PPV-VAA producto de la tinción con acetato de uranilo, fenómeno que ya ha sido reportado para otras estructuras proteicas [113,114]. El D_H promedio disminuyó constantemente con el cambio de pH desde 8.0 hasta 4.5, a diferencia del D_H modal y el diámetro determinado mediante TEM que permanecieron constantes durante todo el experimento. Este comportamiento indica que las PPV-VAA monoméricas no sufrieron cambios de tamaño detectables por la metodología empleada y que el cambio observado en el D_H promedio es consecuencia de la desagregación de dímeros o trímeros de PPV-VAA, cuya presencia en una muestra tiende a incrementar ligeramente el D_H promedio en relación con el D_H modal. Esta hipótesis es congruente con los cambios en la dispersión de tamaño observados para las partículas con D_H menor a 40 nm (**Figura 46-b**) en la que se observa una disminución desde 7 nm hasta 4 nm, lo que representa una disminución del 15% en el porcentaje de polidispersión de estas partículas.

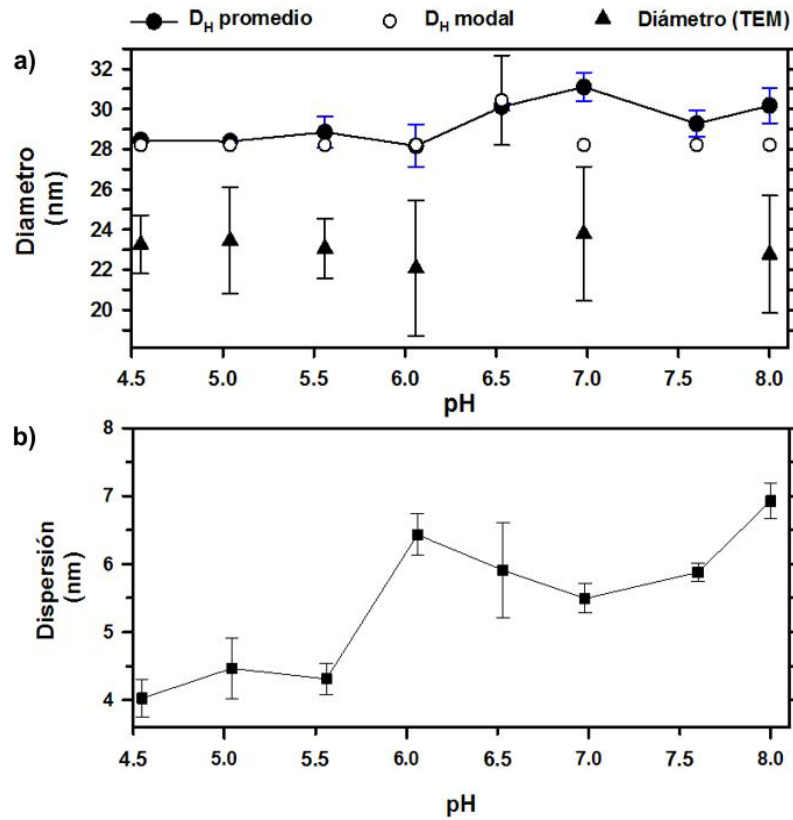


Figura 46.- a) Tamaño de partícula a diferentes valores de pH. Se presentan datos de D_H obtenidos mediante dispersión dinámica de luz y tamaños obtenidos mediante el análisis de imágenes de micrografías electrónicas (se analizaron un mínimo de 36 partículas por pH). Nota: No fue posible analizar las muestras a pH 6.5 y 7.5 por microscopía electrónica. b) Dispersión de tamaño de la población de partículas con D_H menor a 40nm. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados

Se aplicaron pruebas de producto momento de Pearson para el D_H promedio y para la dispersión de la población con D_H menor a 40nm con respecto al pH. Ambas pruebas arrojaron valores de correlación muy altos, que fueron de $\rho_P=0.754$ (valor- $p=0.03$ y potencia del 59%) y $\rho_P=0.835$ (valor- $p= 0.009$ y potencia del 76%) respectivamente. Las relaciones entre el pH, los D_H promedio y dispersiones pueden ser causadas por el cambio de carga eléctrica en la superficie de las PPV-VAA en respuesta al pH, lo que ocasionaría variaciones en las fuerzas de repulsión entre las partículas. Un aumento en las fuerzas de repulsión a pH bajos sería la causa de la desagregación de las partículas. La medición del ζ a diferentes valores de pH sería adecuada para confirmar esta hipótesis.

En la **figura 47** se muestran imágenes representativas de las PPV-VAA a diferentes valores de pH. No se identificaron diferencias en la morfología de las PPV entre las muestras de diferentes valores de pH. Por otro lado, se presentaron dos fenómenos interesantes; 1) Un incremento en el grado de contraste de las micrografías con la disminución del pH de las muestras y 2) la muestra obtenida a pH 8.0 presentó, además de PPV-VAA con un diámetro promedio de 23 nm, estructuras de origen desconocido con un tamaño de 49 ± 6 nm y una morfología similar a la de una cápside de simetría icosaédrica.

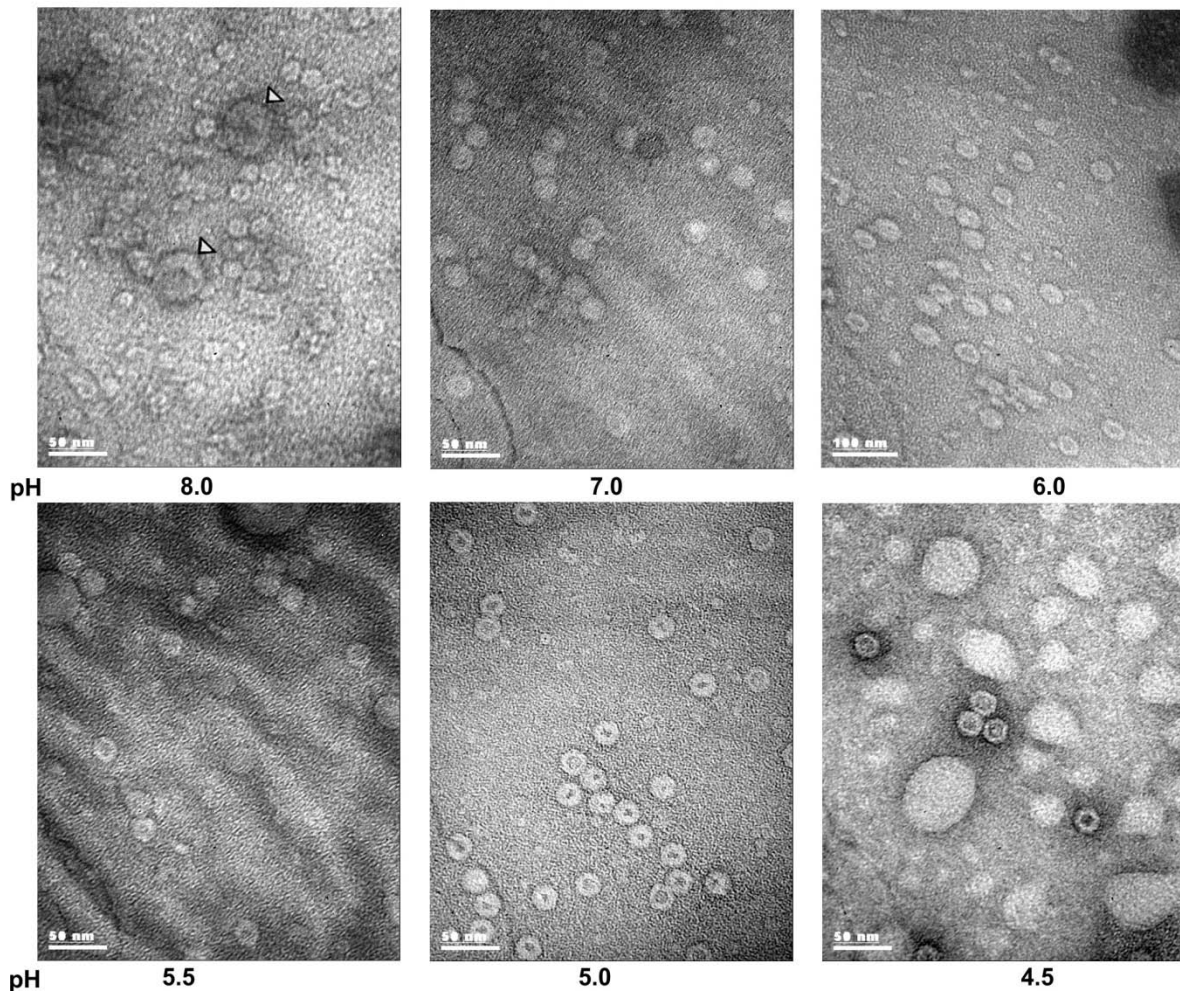


Figura 47.- Micrografías (250,000X) de PPV-VAA incubadas a distintos pH. El número debajo de cada imagen indica el pH de incubación de la muestra. Alícuotas de cada muestra se colocaron en rejillas y fueron teñidas con una solución acida de acetato de uranilo. En la imagen a pH 8.0 pueden observarse dos estructuras (▽) que no presentan el tamaño característico de las PPV-VAA. Es posible observar que las partículas se encuentran mejor contrastadas conforme disminuye el pH.

Nos planteamos dos posibles causas para el fenómeno de aumento de contraste en las micrografías electrónicas producto de la disminución del pH. La primera es que a medida que se disminuyó el pH también se redujo la concentración de sal en las muestras debido a la dilución de las mismas. Es probable que las altas concentraciones de sales en las muestras de pH 8.0 y 7.0, por ejemplo, impidieran la entrada del uranilo en las cápsidas vacías y que por lo tanto se obtuviera un bajo nivel de contraste mientras que el uranilo pudo ingresar fácilmente al interior de las cápsidas en la muestra a pH 4.5, cuya concentración de sal era menor. La segunda posible causa tiene que ver con que la PPV sufriera un cambio conformacional producto del descenso del pH que facilitó la entrada del uranilo al seno de la partícula. Dicho cambio conformacional no se pudo observar mediante dispersión dinámica de luz. Los resultados obtenidos en las mediciones de fluorescencia sustentan esta posibilidad

En la **figura 48-a** se presentan los espectros de fluorescencia obtenidos para las PPV-VAA a diferentes valores de pH. Es evidente la disminución en la intensidad de la fluorescencia con el descenso del pH, aunque los espectros tuvieron forma similar. En todos los espectros se observó un máximo de emisión a 333 nm, este máximo está desplazado hacia el azul en relación al máximo que exhibe el triptófano en solución acuosa. Esta diferencia entre los máximos del triptófano en solución acuosa y el de las PPV-VAA es consecuencia del ambiente que rodea a este aminoácido en el seno de la proteína viral, tal y como sucede con otras proteínas [115]. Se observó una disminución progresiva de la fluorescencia a 333 nm dependiente del pH cuyo análisis de correlación arrojó un valor de $\rho_p=0.997$ (valor- $p < 0.001$ y potencia del 100%) (**Figura 48-b**). En la misma figura se presenta el valor de fluorescencia esperado a cada pH, el cual fue calculado multiplicando la fluorescencia inicial por el factor de dilución obtenido en cada etapa del proceso de titulación. A todos los valores de pH la fluorescencia experimental fue menor que la esperada. Es importante señalar que la fluorescencia del aminoácido aromático triptófano es independiente del pH en el intervalo en el que se trabajó [116,117], por lo que la diferencia entre la fluorescencia experimental y la esperada debe ser consecuencia de un cambio conformacional de PPV-VAA.

Debido a que no fue posible observar a simple vista diferencias en la forma de los espectros de fluorescencia, se calcularon los centros de masa espectral y se graficaron

contra el pH. El cálculo de los centros de masa espectrales es útil para observar cambios en la forma de los espectros de fluorescencia que están relacionados con los cambios conformacionales de las proteínas frente a diferentes estímulos [118,119]. En la **figura 48-c** se observa que la disminución en el pH ocasionó un corrimiento hipsocrómico en el centro de masa espectral, que al ser analizado mediante la prueba de producto momento de Pearson arrojó un valor de $\rho=0.917$ ($p < 0.001$ y potencia del 100%). El cambio en el centro de masa espectral hacia menores longitudes de onda, como los que se observaron con las PPV-VAA, suele estar asociado con una disminución del carácter polar del ambiente al que se encuentra expuesto el aminoácido triptófano[115].

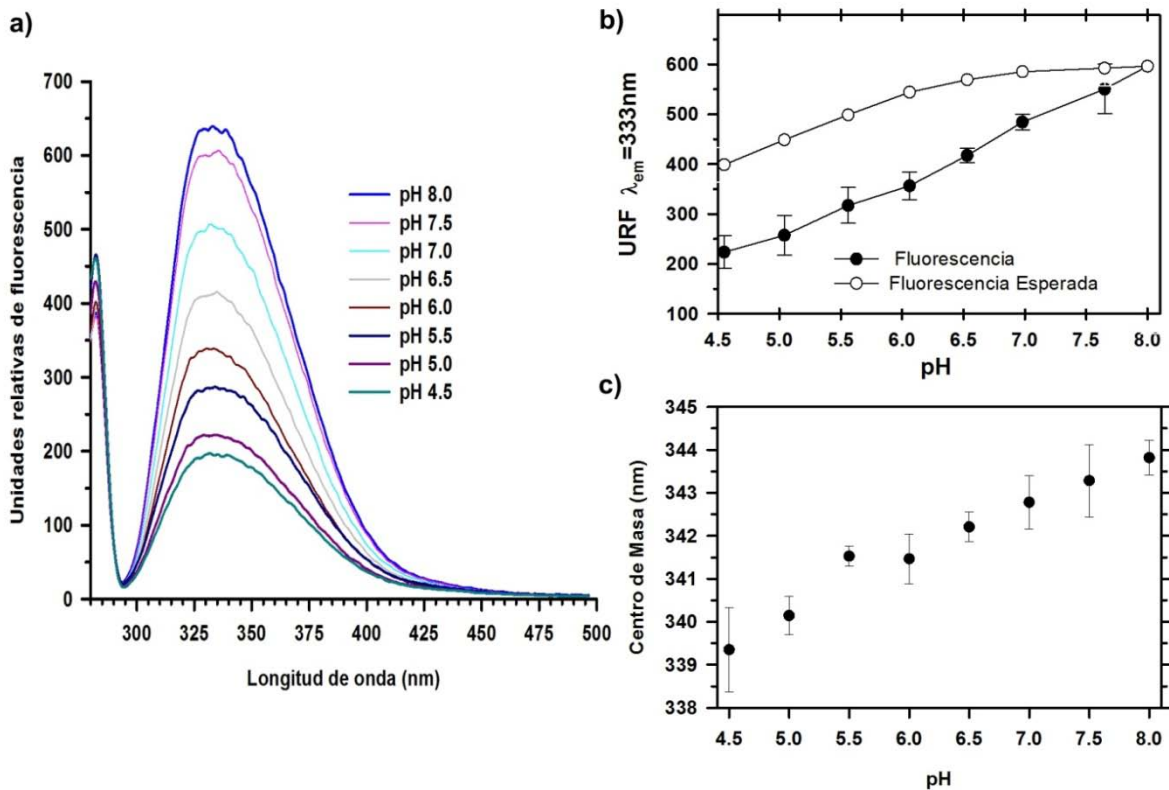


Figura 48.- Mediciones de fluorescencia de PPV-VAA a) Espectros de fluorescencia de las PPV-VAA a diferentes pH. b) Fluorescencia relativa ($\lambda_{em}=333nm$) de muestras con PPV-VAA a diversos pH c) Centro de masa de los espectros de fluorescencia a diferentes valores de pH.

El conjunto de resultados obtenidos en este ensayo sugieren que el pH generó un cambio conformacional en las PPV-VAA. Dicho cambio se reflejó en una disminución en la fluorescencia, así como en un cambio del centro de masa espectral, y probablemente sea el responsable de las diferencias en el grado de contraste de las PPV-VAA observados en las

micrografías electrónicas. Estos resultados indican que la disminución del pH cambió la estructura de la PPV de tal manera que el intercambio de sustancias (en este caso el acetato de uranilo) entre el exterior y el interior se ve favorecido. La falta de un cambio en el D_H modal de las PPV-VAA determinado mediante dispersión dinámica de luz descarta la posibilidad de que se presente una expansión radial de la partícula tal y como sucede con el CCMV. Por lo tanto el incremento en la permeabilidad del interior de la PPV y el cambio conformacional detectado deben de estar relacionados con alteración de la estructura de la PPV a nivel de los poros presentes en los ejes de simetría pentaxial. Dicha hipótesis no puede ser comprobada mediante la metodología empleada en este trabajo.

6.6.5 Sonicación de muestras con PPV-VAA

Se hicieron experimentos de sonicación con la finalidad de evaluar si los agregados (poblaciones de partículas con D_H mayores a 40 nm) en muestras con PPV-VAA podían ser eliminados, así como para determinar si este tratamiento generaba cambios en el D_H de las PPV-VAA. Se evaluó el efecto de hasta cuatro ciclos de sonicación sobre el D_H promedio, D_H modal y abundancia relativa de las poblaciones detectadas.

El porcentaje de partículas no agregadas ($D_H < 40$ nm) incrementó con el número de ciclos de sonicación aplicados a la muestra con la consecuente disminución de la abundancia de la población con un D_H mayor a 650 nm (**Figura 49**). Se hizo un análisis de varianza acompañado de una prueba de comparaciones múltiples con el método de Holm-Sidak contra un grupo control (inicial). Se encontró que existen diferencias significativas (valor- $p < 0.001$ y potencia del 100%) en la abundancia relativa de partículas con $D_H < 40$ nm cuando se aplican 2 o más ciclos de sonicación.

Además de la disminución en su abundancia relativa, la población de partículas con $D_H > 650$ nm presentó una disminución en su D_H promedio a partir del segundo ciclo de sonicación. Esta disminución en D_H promedio no fue estadísticamente significativa tras el análisis de varianza. Por otra parte, los D_H promedio y modal de la población de interés (menor a 40 nm) no cambiaron con ninguno de los tratamientos aplicados (**Figura 50**).

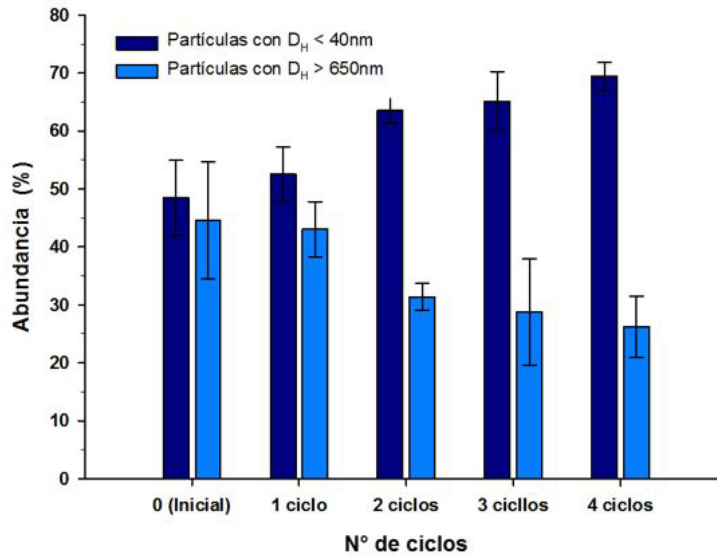


Figura 49.- Cambios en la abundancia relativa de dos poblaciones en muestras de PPV-VAA después de varios ciclos de sonicación. Promedio y desviación estándar de experimentos hechos por triplicado.

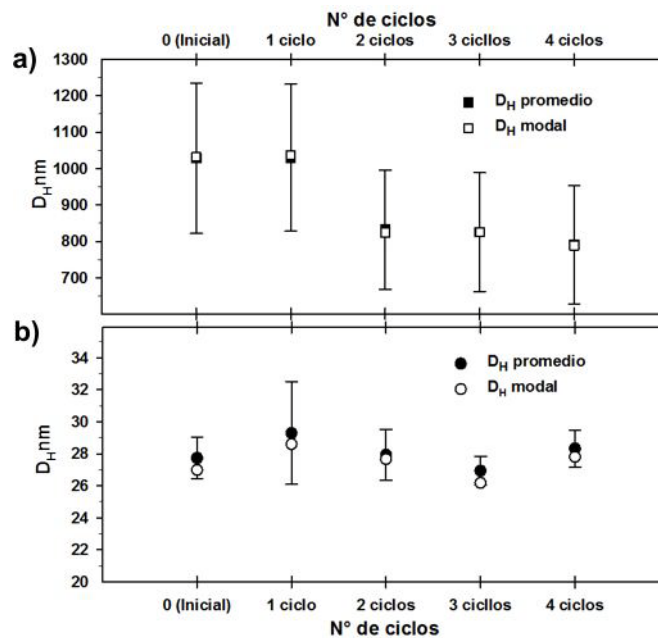


Figura 50.- Cambios en D_H promedio y modal de dos poblaciones de partículas presentes en muestras de PPV-VAA después de varios ciclos de sonicación a) Población con $D_H > 650\text{nm}$ b) Población con $D_H < 650\text{nm}$. Las barras de error indican la desviación estándar de las mediciones realizadas por triplicado

Estos resultados indicaron que la población de partículas con D_H mayor a 650 nm está formada por agregados de PPV-VAA, los cuales pueden ser desagregados mediante sonicación a la amplitud y tiempos ensayados y que dicho tratamiento no tiene ningún efecto sobre el tamaño de las PPV-VAA.

6.7 INCORPORACIÓN DE FLUORESCÉINA A PPV-VAA

El desarrollo de un sistema de entrega de sustancias a partir de bionanopartículas requiere que la sustancia a transportar se encuentre íntimamente ligada a la partícula transportadora. Para lograr este cometido es posible seguir dos caminos. El primero es la unión covalente de la sustancia de interés con la partícula mediante bioconjugación. El segundo es aprovechar las propiedades intrínsecas de algunas estructuras proteicas, como las PPV como jaulas, de tal forma que la unión íntima entre la partícula y la sustancia a transportar se da colocando a esta última en el interior de la jaula sin necesidad de unirlos covalentemente. Con base en los resultados de la caracterización fisicoquímica de las PPV-VAA, nos decidimos por diseñar una estrategia que no requiere la unión covalente entre el fluoróforo (fluoresceína) y la PPV.

Partiendo de la idea de que los poros en los ejes de simetría pentaxial son lo suficientemente grandes para dejar salir el extremo amino terminal de VP1, cabe suponer que permitirán la libre difusión de la fluoresceína hacia el interior de la cápside. Para verificar la suposición anterior, se usó el programa CCP4MG v 1.10 para hacer mediciones del diámetro interno y externo del poro en el eje de simetría pentaxial de la cápside de VAA (entrada: ilp3 en Protein Databank). Posteriormente se superpuso la estructura de la fluoresceína sobre el eje de simetría pentaxial con la finalidad de verificar que no se presentaran impedimentos de tipo estérico. Los diámetros internos y externos del poro de la cápside de VAA son mayores al D_H de la fluoresceína (0.6nm), y la sobreposición de ambas estructuras no mostró impedimentos estéricos (**Figura 51**).

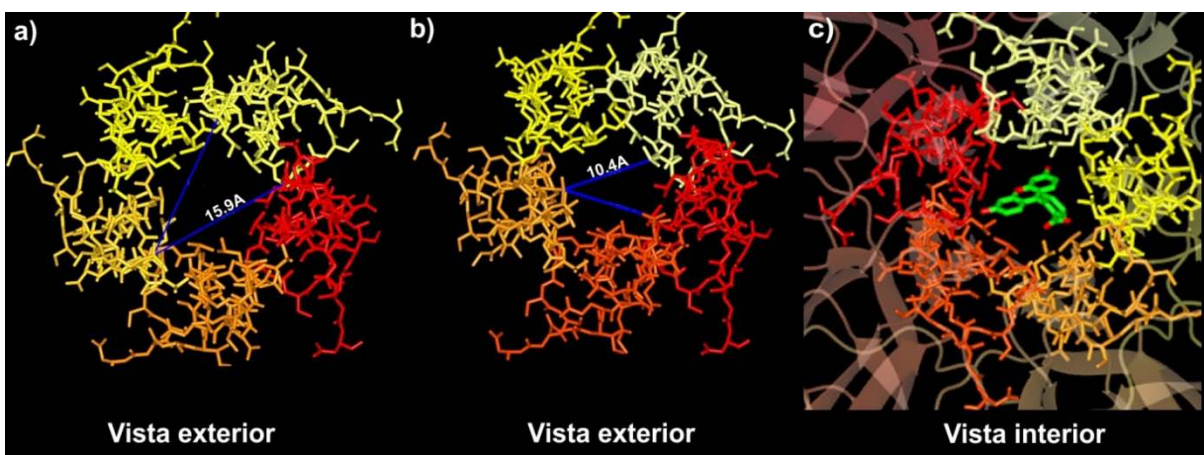


Figura 51.- Mediciones del diámetro externo (a) e interno (b) del poro presente en el eje de simetría pentaxial de la cápside de VAA. c) Sobreposición de una molécula de fluoresceína sobre uno de los poros de la cápside de VAA.

Con base en el ligero incremento de tamaño acompañado de la exposición del dominio amino terminal de VP1 (que a temperatura ambiente se localiza al interior de la cápside) observado a 61°C, se diseñó una estrategia para incorporar la fluoresceína al interior de PPV-VAA. Se prepararon alícuotas de 100 µl con PPV-VAA en buffer de citrato 100 mM-Tris 10 mM y se les adicionó 1 µl de una solución de fluoresceína a una concentración de 600 µg/ml. Las muestras se incubaron 24 horas a 4°C. Cumplido el tiempo, se aplicaron tratamientos diferentes a las muestras: una de ellas se incubó durante 20 minutos a 25°C mientras que la otra se incubó a 61° durante 20 minutos. A esta segunda muestra se le hicieron determinaciones de tamaño de partícula al inicio y la final del periodo de incubación. Ambas muestras se analizaron por exclusión en gel en HPLC y se monitoreó la absorbancia a 280nm y la fluorescencia a dos pares de longitudes de onda excitación-emisión; Ex₂₈₀/Em₃₃₃ y Ex₄₉₅/Em₅₁₇. La segunda medición corresponde a la fluorescencia de la fluoresceína.

En los cromatogramas de ambas muestras se observa que en ninguna de las dos condiciones probadas ocurrió la incorporación estable de la fluoresceína al interior de las PPV-VAA, puesto que no se observó fluorescencia en el par de longitudes de onda Ex₄₉₅/Em₅₁₇ en el tiempo de retención característico de las PPV-VAA (**Figura 52**).

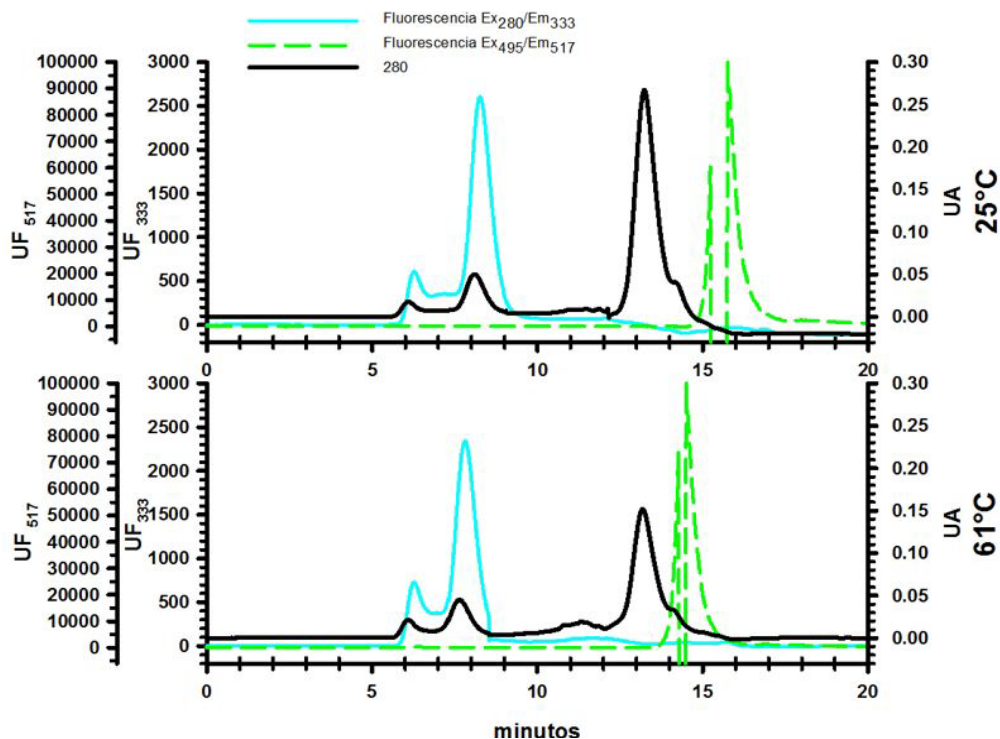


Figura 52.- Análisis mediante HPLC de exclusión molecular de PPV-VAA incubadas en presencia de fluoresceína. a) Muestras incubadas a 25°C. b) Muestras incubadas a 61°C Se monitoreó la absorbancia a 280nm y dos canales de fluorescencia, uno específico para la fluoresceína (Ex₄₉₅/Em₅₁₇) y otro para los triptófanos presentes en la proteína viral (Ex₂₈₀/Em₃₃₃).

En la **figura 53-a** se muestra el espectro de absorción normalizado para el segundo pico obtenido para las muestras incubadas a 25 y 61°C. Este pico corresponde a las PPV-VAA. La forma de ambos espectros es similar, aunque se observaron diferencias, sobre todo en la región entre 240-280 nm, en donde es evidente que incrementó la absorbancia por debajo de los 280 nm para la muestra incubada a 61°C. Este fenómeno puede estar relacionado con el cambio conformacional que sufren las PPV-VAA resultado de su exposición a temperaturas cercanas a la temperatura crítica. De igual forma, en la **figura 53-b** se muestra la distribución de tamaño de partícula para muestras incubadas a 25 y 61°C. Se observa claramente en la distribución de tamaño de la muestra incubada a 61°C un aumento en el D_H de la primera población con respecto al diámetro D_H de la misma población en la muestra a 25°C, así como la aparición de una segunda población. Este cambio en la distribución de tamaño de partícula concuerda con lo descrito en secciones anteriores. Cabe señalar que en ninguna de las dos distribuciones fue posible detectar partículas con un D_H similar al de la fluoresceína. Esto se debe a que la cantidad de luz dispersada por esta molécula es muy pequeña en comparación con la luz dispersada por las PPV-VAA, razón por la cual el equipo de dispersión dinámica de luz no puede “ver” a estas partículas pequeñas.

Concluimos que no se puede llevar a cabo la incorporación de fluoresceína al interior de la PPV mediante la metodología propuesta y que el análisis mediante cromatografía de exclusión en gel confirma los resultados obtenidos mediante dispersión de luz con respecto al efecto del calentamiento de las PPV-VAA sobre su distribución de tamaño de partícula. Esto es; un incremento en el diámetro hidrodinámico de las PPV y la aparición o en este caso incremento en la proporción de agregados presentes en la muestra, los cuales presentan tiempos de elución menores a 6 minutos bajo las condiciones de análisis ensayadas.

El fracaso de la metodología propuesta puede ser producto de la falta de internalización de la fluoresceína en las PPV-VAA, lo cual puede ser ocasionado por repulsiones electrostáticas entre las proteínas virales y la molécula fluorescente. Otra explicación para este fracaso puede ser que la incubación de las PPV-VAA ocasione la exposición del extremo amino terminal de VP1 pero no provoque el cierre de los poros y por lo tanto la

fluoresceína puede difundir hacia el exterior de la partícula durante el análisis cromatográfico.

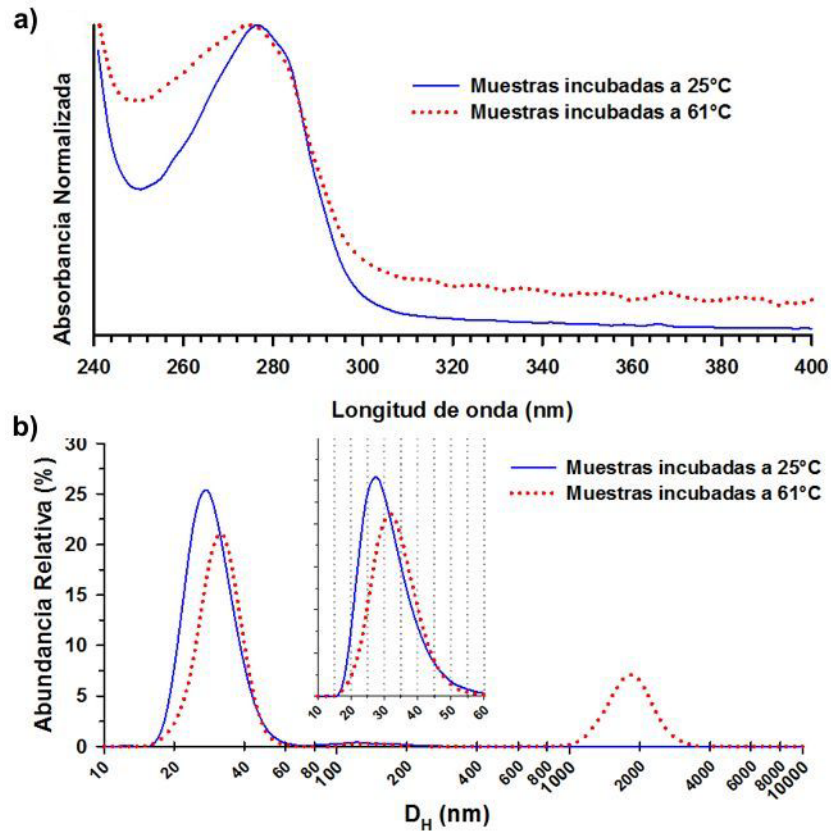


Figura 53.- a) Espectros de absorción del segundo pico detectado en la cromatografía de exclusión molecular de las PPV-VAA incubadas en presencia de fluoresceína a dos temperaturas diferentes (ver figura 52) b) Distribución de tamaño de partícula de una de PPV-VAA incubada con fluoresceína a dos temperaturas diferentes.

CAPITULO 7

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Se identificó que la infección de células Sf9 una MDI de 0.1 ufp/cél a una CCI de 1×10^6 cél/ml resulta en mayores rendimientos de baculovirus bac Cap infecciosos que al uso de MDI o CCI mas altas. Esto permite una amplificación eficiente de los resguardos virales con miras a la obtención de bancos de trabajo para la producción de PPV-VAA. Bajo las condiciones de cultivo se obtuvieron títulos virales de $3.8 \pm 2 \times 10^8$ ufp/mL y rendimientos específicos de 153 ± 82 ufp/cél.

La producción de PPV-VAA en la línea High Five™ permitió alcanzar concentraciones 50% mayores a las producidas en la línea Sf9. Este hallazgo reviste especial importancia, ya que la actual demanda de PPV-VAA para el desarrollo de vectores para terapia génica u otras aplicaciones biotecnológicas, puede ser solventada mediante el uso de esta línea celular. El uso de células de insecto para la producción de PPV permite eliminar problemas de bioseguridad y escalamiento asociados con el uso de líneas celulares derivadas de mamíferos.

El método de purificación desarrollado en este trabajo, permitió la purificación de PPV-VAA con un alto grado de pureza (99%) en tan solo un día de trabajo. El uso de cromatografía de intercambio aniónico para la purificación de PPV-VAA representa una alternativa frente al uso de otras metodologías más costosas (cromatografía de afinidad a anticuerpos), o poco versátiles (afinidad a sulfato de heparina). La combinación de intercambio aniónico y gradientes isopícnicos en iodixanol permitió la obtención de muestras con un menor porcentaje de agregados (12%) en comparación con la purificación mediante doble gradientes en CsCl que resultaron en un 40% de estructuras agregadas. Si bien el rendimiento final fue bajo, de alrededor del 10%, el método desarrollado en este trabajo puede ser optimizado mediante el uso de protocolos de elución diferentes durante el intercambio aniónico o el uso de dispositivos de ultrafiltración (filtración tangencial u otros

materiales) que ocasionen menos pérdidas durante las etapas de concentración de las muestras producto de la interacción de las PPV-VAA con las membranas de ultrafiltración.

El análisis de muestras de PPV-VAA mediante ASEC demostró ser capaz de resolver e identificar diferentes estados de agregación de las PPV-VAA. Con esta metodología es posible evaluar la calidad de muestras de PPV-VAA obtenidas mediante diferentes métodos de purificación. Otra posible aplicación es el observar el desensamblaje, cambios de tamaño, o agregación de las PPV-VAA en ensayos de estabilidad.

Los resultados que obtuvimos durante la caracterización de las PPV-VAA frente a diferentes condiciones fisicoquímicas constituyen una fuente de información valiosa para el desarrollo de experimentos de estabilidad para formulaciones de estas PPV. Por otra parte estos resultados nos permitieron identificar factores que desencadenan cambios conformacionales de las partículas. Los resultados más destacados son:

- Que las PPV-VAA soportan temperaturas de hasta 59°C por periodos prolongados de tiempo sin que esto ocasione la pérdida de la estructura tridimensional de la partícula, o su agregación.
- Que a 61°C las partículas sufren un cambio conformacional que se caracteriza por la exposición del extremo amino terminal de la proteína VP1, que a temperatura ambiente se localiza al interior de las partículas.
- Se confirmó el resultado reportado por otro grupo de trabajo sobre la capacidad de la solución amortiguadora de citrato 100 mM-Tris 10 mM pH 8.0 para minimizar la agregación de las PPV-VAA durante su almacenamiento. Esta solución es fisiológicamente compatible por lo que representa una alternativa para la preparación de formulación destinadas a la administración a seres vivos.
- Mediante sonicación fue posible revertir hasta en un 25% la agregación de las PPV-VAA que se observó en algunas muestras producto de su almacenamiento a 4°C.
- El aumento de la permeabilidad de las PPV-VAA así como un cambio conformacional producto de la disminución del pH desde 8.0 hasta 4.5.

Consideramos necesario ampliar la información generada en este trabajo con respecto a la caracterización de las PPV-VAA mediante metodologías como difracción circular,

espectroscopia de Raman o calorimetría diferencial de barrido. Esto permitirá identificar con mayor precisión y detalle la naturaleza de los cambios observados.

La estrategia propuesta en este trabajo para la funcionalización de las PPV-VAA, no permitió lograr la introducción de la fluoresceína en el seno de las PPV. Sin embargo es importante hacer notar que la estrategia empleada se diseñó exclusivamente a partir de los resultados obtenidos durante la caracterización frente a los cambios de temperatura. Creemos que la implementación de otras estrategias que recurran a cambios en el pH de la solución en la que se encuentran las PPV-VAA permitirá lograr el último objetivo planteado en este trabajo.

REFERENCIAS

- [1] Jain KK. Drug delivery systems - an overview. *Methods In Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 2008;437:1-50.
- [2] Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature* 1998;392:5-10.
- [3] Cromwell MEM. Biotechnology-derived drug products : formulation development. In: Swarbrick J, editor. *Encyclopedia of pharmaceutical technology*, New York: Informa Healthcare; 2007, pp. 281-301.
- [4] Jain KK. *The handbook of nanomedicine*. Humana Press Inc; 2008.
- [5] Marcato PD, Durán N. New aspects of nanopharmaceutical delivery systems. *Journal of Nanoscience Of and Nanotechnology* 2008;8:2216-2229.
- [6] Singh P, Gonzalez MJ, Manchester M. Viruses and their uses in nanotechnology. *Drug Development Research* 2006;67:23–41.
- [7] Lee LA, Wang Q. Adaptations of nanoscale viruses and other protein cages for medical applications. *Nanomedicine : Nanotechnology, Biology, and Medicine* 2006;2:137-49.
- [8] Lee LA, Niu Z, Wang Q. Viruses and virus-like protein assemblies—chemically programmable nanoscale building blocks. *Nano Research* 2010;2:349-364.
- [9] Flenniken M, Uchida M, Liepold L, Kang S, Young M, Douglas T. A library of protein cage architectures as nanomaterials. In: Manchester M, Steinmetz NF, editors. *Viruses and nanotechnology*, vol. 327, Springer-Verlag; 2009, pp. 71–93.
- [10] Grgacic EVL, Anderson DA. Virus-like particles: passport to immune recognition. *Methods* 2006;40:60–65.
- [11] Roldão A, Mellado MCM, Castilho LR, Carrondo MJT, Alves PM. Virus-like particles in vaccine development. *Expert Reviews of Vaccines* 2010;9:1149-76.
- [12] Noad R, Roy P. Virus-like particles as immunogens. *Trends In Microbiology* 2003;11:438-444.
- [13] Pattenden LK, Middelberg APJ, Niebert M, Lipin DI. Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends In Biotechnology* 2005;23:523-9.

- [14] Rohrmann G. The baculovirus replication cycle: effects on cells and insects. In: Rohrmann GF, editor. *Baculovirus molecular biology*, Bookshelf; 2008, pp. 1-23.
- [15] Murphy CI, Piwnica-Worms H, Grünwald S, Romanow WG, Francis N, Fan H-ying. Overview of the baculovirus expression system. In: Ausubel FM, editor. *Current Protocols in Molecular Biology*, vol. Chapter 16, 2004, p. Unit 16.9.
- [16] Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramirez OT. Principles and applications of the insect cell-baculovirus expression vector system. In: Ozturk SS, Wei-Shou H, editors. *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cell-based Therapies*, vol. 30, CRC Press; 2005, pp. 627-692.
- [17] Radford KM, Cavegn C, Bertrand M, Bernard AR, Reid S, Greenfield PF. The indirect effects of multiplicity of infection on baculovirus expressed proteins in insect cells: secreted and non-secreted products. *Cytotechnology* 1997;24:73–81.
- [18] Hu YC, Bentley WE. 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* 2001;75:104-19.
- [19] Maranga L, Brazão TF, Carrondo MJT. Virus-like particle production at low multiplicities of infection with the baculovirus insect cell system. *Biotechnology and Bioengineering* 2003;84:245–253.
- [20] Gallo L. Estudio de la producción de vectores de virus adeno-asociado tipo 2 en el sistema de células de insecto-baculovirus. Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología-UNAM, 2007.
- [21] Berns KI, Parrish CR. Parvoviridae. *Fields Virology* 2007:2437-2477.
- [22] Büning H, Perabo L, Coutelle O, Quadt-Humme S, Hallek M. Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *The Journal of Gene Medicine* 2008;10:717–733.
- [23] Merten O-W, Gény-Fiamma C, Douar AM. Current issues in adeno-associated viral vector production. *Gene Therapy* 2005;12 Suppl 1:S51-61.
- [24] Sonntag F, Schmidt K, Kleinschmidt JA. A viral assembly factor promotes AAV-2 capsid formation in the nucleolus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2010;107:10220.
- [25] Samulski R, Zhu X, Xiao X, Brook J, Housman D, Epstein N, Hunter L. Targeted integration of adeno-associated virus (aav) into human chromosome 19. *The EMBO Journal* 1991;10:3941.

- [26] Linden RM, Ward P, Giraud C, Winocour E, Berns KI. Site-specific integration by adeno-associated virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1996;93:11288-94.
- [27] Rabinowitz JE, Bowles DE, Faust SM, Ledford JG, Cunningham SE, Samulski RJ. Cross-dressing the virion: the transcapsidation of adeno-associated virus serotypes functionally defines subgroups. *Journal of Virology* 2004;78:4421.
- [28] Rutledge E a, Halbert CL, Russell DW. Infectious clones and vectors derived from adeno-associated virus (aav) serotypes other than aav type 2. *Journal of Virology* 1998;72:309-19.
- [29] Grimm D, Kay MA. From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Current Gene Therapy* 2003;3:281-304.
- [30] Gao G, Vandenberghe LH, Alvira MR, Lu Y, Calcedo R, Zhou X, Wilson JM. Clades of adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *Journal of Virology* 2004;78:6381-6388.
- [31] Negrete A, Kotin RM. Large-scale production of recombinant adeno-associated viral vectors. In: Le Doux JM, editor. *Methods in Molecular Biology* volumen 1: Production and in Vivo Applications, vol. 433, Totowa, NJ: Human Press; 2008, pp. 79-96.
- [32] Summerford C, Bartlett JS, Samulski RJ. Alphavbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nature Medicine* 1999;5:78-82.
- [33] Bartlett JS, Wilcher R, Samulski RJ. Infectious entry pathway of adeno-associated virus and adeno-associated virus vectors. *Journal of Virology* 2000;74:2777-85.
- [34] Kronenberg S, Bottcher B, Von Der Lieth CW, Bleker S, Kleinschmidt JA. A conformational change in the adeno-associated virus type 2 capsid leads to the exposure of hidden vp1 n termini. *Journal of Virology* 2005;79:5296.
- [35] Becerra SP, Koczot F, Fabisch P, Rose J a. Synthesis of adeno-associated virus structural proteins requires both alternative mrna splicing and alternative initiations from a single transcript. *Journal of Virology* 1988;62:2745-54.
- [36] Wistuba A, Weger S, Kern A, Kleinschmidt JA. Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing rep and cap proteins. *Journal of Virology* 1995;69:5311.
- [37] Ruffing M, Zentgraf H, Kleinschmidt JA. Assembly of viruslike particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *Journal of Virology* 1992;66:6922-30.

-
- [38] Warrington Jr KH, Gorbatyuk OS, Harrison JK, Opie SR, Zolotukhin S, Muzyczka N. Adeno-associated virus type 2 VP2 capsid protein is nonessential and can tolerate large peptide insertions at its n terminus. *Journal of Virology* 2004;78:6595.
- [39] Timpe J, Bevington J, Casper J, Dignam JD, Trempe JP. Mechanisms of adeno-associated virus genome encapsidation. *Current Gene Therapy* 2005;5:273-84.
- [40] Van Vliet KM, Blouin V, Brument N, Agbandje-McKenna M, Snyder RO. The role of the adeno-associated virus capsid in gene transfer. *Drug Delivery Systems:Methods In Molecular Biology* 2008;437:51-91.
- [41] Opie SR, Warrington KH, Agbandje-mckenna M, Zolotukhin S, Muzyczka N. Identification of amino acid residues in the capsid proteins of adeno-associated virus type 2 that contribute to heparan sulfate proteoglycan binding. *Journal of Virology* 2003;77:6995-7006.
- [42] DiPrimio N, Asokan A, Govindasamy L, Agbandje-McKenna M, Samulski RJ. Surface loop dynamics in adeno-associated virus capsid assembly. *Journal of Virology* 2008;82:5178-89.
- [43] Xie Q, Bu W, Bhatia S, Hare J, Somasundaram T, Azzi A, Chapman MS. The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proceedings Of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:10405-10.
- [44] Kronenberg S, Kleinschmidt JA, Böttcher B. Electron cryo-microscopy and image reconstruction of adeno-associated virus type 2 empty capsids. *EMBO Reports* 2001;2:997-1002.
- [45] Kern A, Schmidt K, Leder C, Muller O, Wobus C, Bettinger K, Von der Lieth C, King J, Kleinschmidt J. Identification of a heparin-binding motif on adeno-associated virus type 2 capsids. *Journal of Virology* 2003;77:11072.
- [46] Gerlach B, Kleinschmidt J a, Böttcher B. Conformational changes in adeno-associated virus type 1 induced by genome packaging. *Journal of Molecular Biology* 2011:1-12.
- [47] Raja K, Wang Q. Bionanoparticles. *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology* 2004:321–330.
- [48] Sen Gupta S, Kuzelka J, Singh P, Lewis WG, Manchester M, Finn MG. Accelerated bioorthogonal conjugation: a practical method for the ligation of diverse functional molecules to a polyvalent virus scaffold. *Bioconjugate Chemistry* 2005;16:1572-9.
- [49] Wang Q, Kaltgrad E, Lin T, Johnson JE, Finn MG. Natural supramolecular building blocks. wild-type cowpea mosaic virus. *Chemistry & Biology* 2002;9:805-11.

-
- [50] Schmidt U, Gunther C, Rudolph R, Böhm G. Protein and peptide delivery via engineered polyomavirus-like particles. *The FASEB Journal* 2001;15:1646-1648.
- [51] Douglas T, Young M. Host-guest encapsulation of materials by assembled virus protein cages. *Nature* 1998;393:152-155.
- [52] Abbing A, Blaschke UK, Grein S, Kretschmar M, Stark CMB, Thies MJW, Weigand M, Woith DC, Reiser COA. Efficient intracellular delivery of a protein and a low molecular weight substance via recombinant polyomavirus-like particles. *The Journal of Biological Chemistry* 2004;279:27410 -27421.
- [53] Portney NG, Ozkan M. Nano-oncology: drug delivery, imaging, and sensing. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 2006;384:620-630.
- [54] Lewis JD, Destito G, Zijlstra A, Gonzalez MJ, Quigley JP, Manchester M, Stuhlmann H. Viral nanoparticles as tools for intravital vascular imaging. *Nature Medicine* 2006;12:354-60.
- [55] Singh P, Destito G, Schneemann A, Manchester M. Canine parvovirus-like particles, a novel nanomaterial for tumor targeting. *Journal of Nanobiotechnology* 2006;4:2.
- [56] Liu H. Pseudo-atomic models of swollen ccmv from cryo-electron microscopy data. *Journal of Structural Biology* 2003;142:356-363.
- [57] Lepault J, Petitpas I, Erk I, Navaza J, Bigot D, Dona M, Vachette P, Cohen J, Rey F a. Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *The EMBO Journal* 2001;20:1498-507.
- [58] Ren Y, Wong S-M, Lim L-Y. In vitro-reassembled plant virus-like particles for loading of polyacids. *The Journal of General Virology* 2006;87:2749-54.
- [59] P.J.G. B, Mayo MA. Molecular architecture and assembly of tobacco mosaic virus particles. In: Rowlands DJ, Mayo MA, Mahy BWJ, editors. *The molecular biology of the positive strand RNA viruses*, London: Academic Press Inc; 1987, pp. 237-257.
- [60] Salunke DM, Caspar D, Garcea RL. Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 1986;46:895-904.
- [61] Flenniken ML, Liepold LO, Crowley BE, Willits D a, Young MJ, Douglas T. Selective attachment and release of a chemotherapeutic agent from the interior of a protein cage architecture. *Chemical Communications (Cambridge, England)* 2005;2:447-9.
- [62] Webb PA. A primer on particle sizing by static laser light scattering. *Micromeritics* 2000.

- [63] Nobbmann U, Connah M, Fish B, Varley P, Gee C, Mulot S, Chen J, Zhou L, Lu Y, Shen F, Yi J, Harding SE. Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnology & Genetic Engineering Reviews* 2007;24:117-28.
- [64] Casini GL, Graham D, Heine D, Garcea RL, Wu DT. In vitro papillomavirus capsid assembly analyzed by light scattering. *Virology* 2004;325:320-7.
- [65] Tsoka S, Holwill I, Hoare M. Virus-like particle analysis in yeast homogenate using a laser light-scattering assay. *Biotechnology and Bioengineering* 1999;63:290-7.
- [66] Bowen WR, Hall NJ, Pan LC, Sharif AO, Williams PM. The relevance of particle size and zeta-potential in protein processing. *Nature Biotechnology* 1998;16:785–787.
- [67] O'Reilly DR, Miller LK, Luckow VA. *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. New York: Oxford University press; 1994.
- [68] Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *BioTechniques* 2003;34:260-264.
- [69] Chahal PS, Aucoin MG, Kamen A. Primary recovery and chromatographic purification of adeno-associated virus type 2 produced by baculovirus/insect cell system. *Journal of Virological Methods* 2007;139:61-70.
- [70] Zolotukhin S, Byrne BJ, Mason E, Zolotukhin I, Potter M, Chesnut K, Summerford C, Samulski RJ, Muzyczka N. Recombinant adeno-associated virus purification using novel methods improves infectious titer and yield. *Gene Therapy* 1999;6:973-85.
- [71] Popov S, Brown a, Poo MM. Forward plasma membrane flow in growing nerve processes. *Science (New York, N.Y.)* 1993;259:244-6.
- [72] Davis TR, Wickham TJ, McKenna KA, Granados RR, Shuler ML, Wood HA. Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines. *In Vitro Cellular & Developmental Biology. Animal* 1993;29A:388-90.
- [73] Keith MB, Farrell PJ, Iatrou K, Behie L a. Screening of transformed insect cell lines for recombinant protein production. *Biotechnology Progress* 1999;15:1046-52.
- [74] Kwon MS, Dojima T, Park EY. Comparative characterization of growth and recombinant protein production among three insect cell lines with four kinds of serum free media. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 2003;8:142–146.
- [75] Ikonomou L, Bastin G, Schneider Y-J, Agathos SN. Effect of partial medium replacement on cell growth and protein production for the high-five trade mark insect cell line. *Cytotechnology* 2004;44:67-76.

-
- [76] Almeida AFD, Macedo GRD, Chan LCL, Pedrini MRDS. Kinetic analysis of in vitro production of wild-type *Spodoptera frugiperda* nucleopolyhedrovirus. *Brazilian Archives of Biology and Technology* 2010;53:285-291.
- [77] Mena JA. Desarrollo de estrategias racionales de producción de pseudo-partículas virales en el sistema de células de insecto-baculovirus. Tesis de Doctorado. Instituto de Biotecnología-UNAM, 2007.
- [78] Aucoin MG, Perrier M, Kamen AA. Production of adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: optimization of baculovirus concentration ratios. *Biotechnology and Bioengineering* 2006;95:1081-1092.
- [79] Mena JA, Aucoin MG, Montes J, Chahal PS, Kamen AA. Improving adeno-associated vector yield in high density insect cell cultures. *The Journal of Gene Medicine* 2010;12:157-167.
- [80] Wickham TJ, Davis T, Granados RR, Shuler ML, Wood HA. Screening of insect cell lines for the production of recombinant proteins and infectious virus in the baculovirus expression system. *Biotechnology Progress* 1992;8:391-6.
- [81] Hutchinson I, Fooks AR, Smith R, Stacey GN. Selection of host cell lines for scale-up growth conditions of a recombinant baculovirus vector expressing the measles virus nucleocapsid protein. *Biotechnology Techniques* 1995;9:907-912.
- [82] Meghrous J, Aucoin MG, Jacob D, Chahal PS, Arcand N, Kamen AA. Production of recombinant adeno-associated viral vectors using a baculovirus/insect cell suspension culture system: from shake flasks to a 20-l bioreactor. *Biotechnology Progress* 2005;21:154-60.
- [83] Van Vliet K, Blouin V, Agbandje-McKenna M, Snyder RO. Proteolytic mapping of the adeno-associated virus capsid. *Molecular therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy* 2006;14:809-21.
- [84] Jiang B, Barniak V, Smith RP, Sharma R, Corsaro B, Hu B, Madore HP. Synthesis of rotavirus-like particles in insect cells: comparative and quantitative analysis. *Biotechnology and Bioengineering* 1998;60:369-74.
- [85] Lee M-S, Doong S-R, Lai S-Y, Ho J-Y, Wang M-Y. Processing of infectious bursal disease virus (IBDV) polyprotein and self-assembly of IBDV-like particles in high-5 cells. *Biotechnology Progress* 2006;22:763-9.
- [86] Burova E, Ioffe E. Chromatographic purification of recombinant adenoviral and adeno-associated viral vectors: methods and implications. *Gene Therapy* 2005;12 Suppl 1:S5-17.

- [87] Brument N, Morenweiser R, Blouin V, Toublanc E, Raimbaud I, Chérel Y, Folliot S, Gaden F, Boulanger P, Kroner-lux G, Moullier P, Rolling F, Salvetti A. A versatile and scalable two-step ion-exchange chromatography process for the purification of recombinant adeno-associated virus serotypes-2 and -5. *Molecular Therapy* 2002;6:678-686.
- [88] Kaludov N, Handelman B, Chiorini JA. Scalable purification of adeno-associated virus type 2, 4, or 5 using ion-exchange chromatography. *Human Gene Therapy* 2002;13:1235–1243.
- [89] Fabían-Macedo JC. Estudio del efecto de las variables de proceso en la purificación del antígeno de superficie de hepatitis b (HBsAg). Tesis de Maestría. Instituto de Biotecnología- UNAM, 2007.
- [90] Duisit G, Saleun S, Douthe S, Barsoum J, Chadeuf G, Moullier P. Baculovirus vector requires electrostatic interactions including heparan sulfate for efficient gene transfer in mammalian cells. *The Journal of Gene Medicine* 1999;1:93-102.
- [91] Vicente T, Peixoto C, Alves PM, Carrondo MJT. Modeling electrostatic interactions of baculovirus vectors for ion-exchange process development. *Journal of Chromatography. A* 2010;1217:3754-64.
- [92] Urabe M, Xin K-Q, Obara Y, Nakakura T, Mizukami H, Kume A, Okuda K, Ozawa K. Removal of empty capsids from type 1 adeno-associated virus vector stocks by anion-exchange chromatography potentiates transgene expression. *Molecular therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy* 2006;13:823-8.
- [93] Ford T, Graham J, Rickwood D. Iodixanol: a nonionic iso-osmotic centrifugation medium for the formation of self-generated gradients. *Analytical Biochemistry* 1994;220:360-6.
- [94] Hermens WT, Ter Brake O, Dijkhuizen P a, Sonnemans MA, Grimm D, Kleinschmidt JA, Verhaagen J. Purification of recombinant adeno-associated virus by iodixanol gradient ultracentrifugation allows rapid and reproducible preparation of vector stocks for gene transfer in the nervous system. *Human Gene Therapy* 1999;10:1885-91.
- [95] Urabe M, Ding C, Kotin RM. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Human Gene Therapy* 2002;13:1935-43.
- [96] Qu G, Bahr-Davidson J, Prado J, Tai A, Cataniag F, McDonnell J, Zhou J, Hauck B, Luna J, Sommer JM, Smith P, Zhou S, Colosi P, High K a, Pierce GF, Wright JF. Separation of adeno-associated virus type 2 empty particles from genome containing vectors by anion-exchange column chromatography. *Journal of Virological Methods* 2007;140:183-92.

-
- [97] Rawle A, Carlos J. Principios básicos del análisis del tamaño de partículas. Malvern Instruments 2003.
- [98] Laurence JS, Middaugh CR. Fundamental structures and behaviors of proteins. In: Wang W, Roberts CJ, editors. Aggregation of therapeutic proteins, New Jersey: Wiley and Sons Inc; 2010, pp. 1-61.
- [99] Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. Quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography B* 2005;824:267-76.
- [100] Jackson C, Barth HG. Molecular weight-sensitive detectors for size exclusion chromatography. In: Wu C-S, editor. Handbook of size exclusion chromatography, New York: Marcel Dekker Inc.; 1995, pp. 103-146.
- [101] Wei Z, McEvoy M, Razinkov V, Polozova A, Li E, Casas-Finet J, Tous GI, Balu P, Pan AA, Mehta H, Schenerman MA. Biophysical characterization of influenza virus subpopulations using field flow fractionation and multiangle light scattering: correlation of particle counts, size distribution and infectivity. *Journal of Virological Methods* 2007;144:122-32.
- [102] Smith RH, Yang L, Kotin RM. Chromatography-based purification of adeno-associated virus. *Methods In Molecular Biology* (Clifton, N.J.) 2008;434:37-54.
- [103] Himmel ME, Baker JO, Mitchell DJ. Size exclusion of proteins. In: Wu C-S, editor. Handbook of size exclusion chromatography, New York: Marcel Dekker Inc.; 1995, pp. 429-446.
- [104] Zolotukhin S. Production of recombinant adeno-associated virus vectors. *Human Gene Therapy* 2005;16:551-7.
- [105] Croyle M a, Cheng X, Wilson JM. Development of formulations that enhance physical stability of viral vectors for gene therapy. *Gene Therapy* 2001;8:1281-90.
- [106] Jorio H, Tran R, Kamen A. Stability of serum-free and purified baculovirus stocks under various storage conditions. *Biotechnology Progress* 2006;22:319-25.
- [107] Xie Q, Hare J, Turnigan J, Chapman MS. Large-scale production , purification and crystallization of. *Journal of Virological Methods* 2004;122:17-27.
- [108] Kissmann J, Ausar SF, Foubert TR, Brock J, Switzer MH, Detzi EJ, Vedvick TS, Middaugh CR. Physical stabilization of norwalk virus-like particles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2008;97:4208–4218.
- [109] Wright JF, Le T, Prado J, Bahr-Davidson J, Smith PH, Zhen Z, Sommer JM, Pierce GF, Qu G. Identification of factors that contribute to recombinant AAV-2 particle aggregation and methods to prevent its occurrence during vector purification and

- formulation. *Molecular therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy* 2005;12:171-8.
- [110] Bleker S, Sonntag F, Kleinschmidt JA. Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase a2 activity. *Journal of Virology* 2005;79:2528.
- [111] Gerlach B, Kleinschmidt J a, Böttcher B. Conformational changes in adeno-associated virus type 1 induced by genome packaging. *Journal of Molecular Biology* 2011:1-12.
- [112] Nagai H, Kuwabara K, Carta G. Temperature dependence of the dissociation constants of several amino acids. *Journal of Chemical & Engineering Data* 2008;53:619–627.
- [113] McDermott J, Mayo K, Barklis E. Three-dimensional organization of retroviral capsid proteins on a lipid monolayer. *Journal of Molecular Biology* 2000;302:121-33.
- [114] Stoops JK, Baker TS, Schroeter JP, Kolodziej SJ, Niu XD, Reed LJ. Three-dimensional structure of the truncated core of the *saccharomyces cerevisiae* pyruvate dehydrogenase complex determined from negative stain and cryoelectron microscopy images. *The Journal of Biological Chemistry* 1992;267:24769-75.
- [115] Lakcowicz JR, editor. Protein fluorescence. In: *Principles of fluorescence spectroscopy*, Singapur: Springer; 2006, pp. 529-575.
- [116] White A. Effect of pH on fluorescence of tyrosine, tryptophan and related compounds. *Biochemical Journal* 1959;71:217.
- [117] Robbins RJ, Fleming GR, Beddard GS, Robinson GW, Thistlethwaite PJ, Woolfe GJ. Photophysics of aqueous tryptophan: pH and temperature effects. *Journal of the American Chemical Society* 1980;102:6271-6279.
- [118] Weng J, Tan C, Shen J-R, Yu Y, Zeng X, Xu C, Ruan K. pH-induced conformational changes in the soluble manganese-stabilizing protein of photosystem ii. *Biochemistry* 2004;43:4855-61.
- [119] Gaspar LP, Terezan a F, Pinheiro a S, Foguel D, Rebello M a, Silva JL. The metastable state of nucleocapsids of enveloped viruses as probed by high hydrostatic pressure. *The Journal of Biological Chemistry* 2001;276:7415-21.

ANEXOS

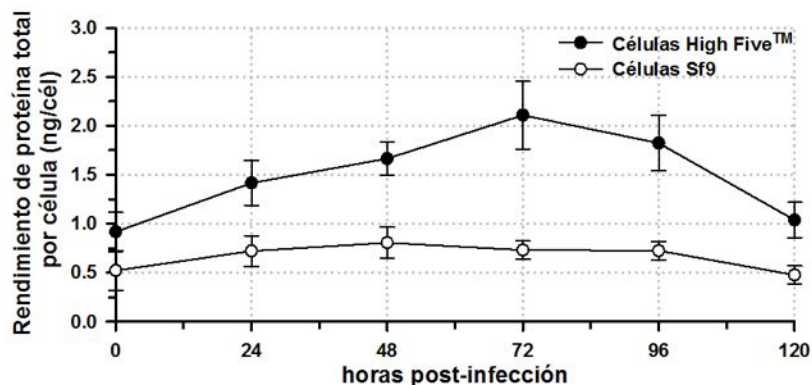
Anexo A

Concentración de proteína soluble total en muestras de extracto celular y sobrenadante de cultivos infectados. Se muestran los promedios y desviaciones estándar de los triplicados

Proteína soluble total (mg/ml):				
hpi	Células High Five		Células Sf9	
	Extracto celular	Sobrenadante	Extracto celular	Sobrenadante
0	0.69 ± 0.16	0.08 ± 0.01	0.33 ± 0.16	0.08 ± 0.01
24	1.39 ± 0.18	0.16 ± 0.02	0.71 ± 0.18	0.12 ± 0.02
48	1.52 ± 0.10	0.52 ± 0.03	0.74 ± 0.10	0.25 ± 0.03
72	1.51 ± 0.09	0.95 ± 0.07	0.58 ± 0.09	0.61 ± 0.07
96	1.00 ± 0.11	0.88 ± 0.02	0.48 ± 0.11	0.63 ± 0.02
120	0.45 ± 0.08	0.59 ± 0.04	0.28 ± 0.08	0.42 ± 0.04

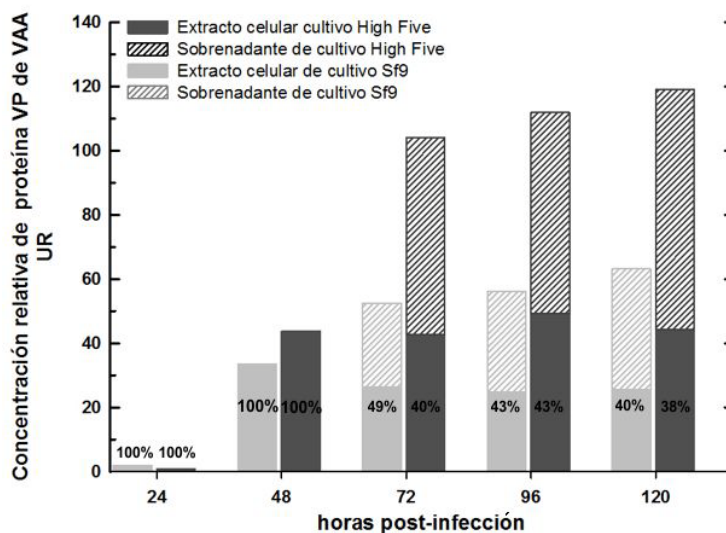
Anexo B

Rendimiento de proteína total por célula (ng/cél) durante el cultivo de dos líneas celulares infectadas con el baculovirus bac-Cap. Las células High Five™ duplicaron su rendimiento hacia las 72 horas de cultivo mientras que para las células Sf9 no se observaron cambios durante todo el periodo de cultivo.



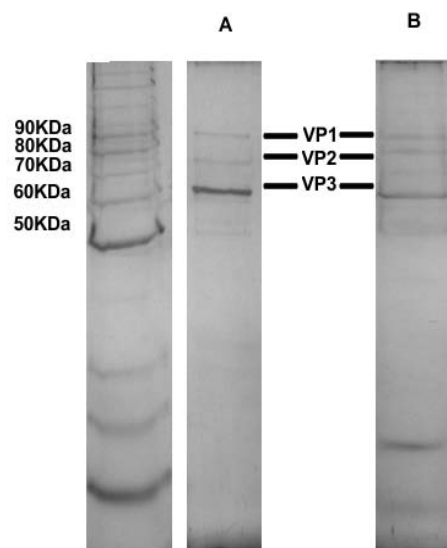
Anexo C

Distribución de la proteína de VAA entre el sobrenadante y el extracto celular a lo largo del cultivo para dos líneas celulares. Los valores de porcentaje en cada barra indican la fracción de proteína detectada en el extracto celular.



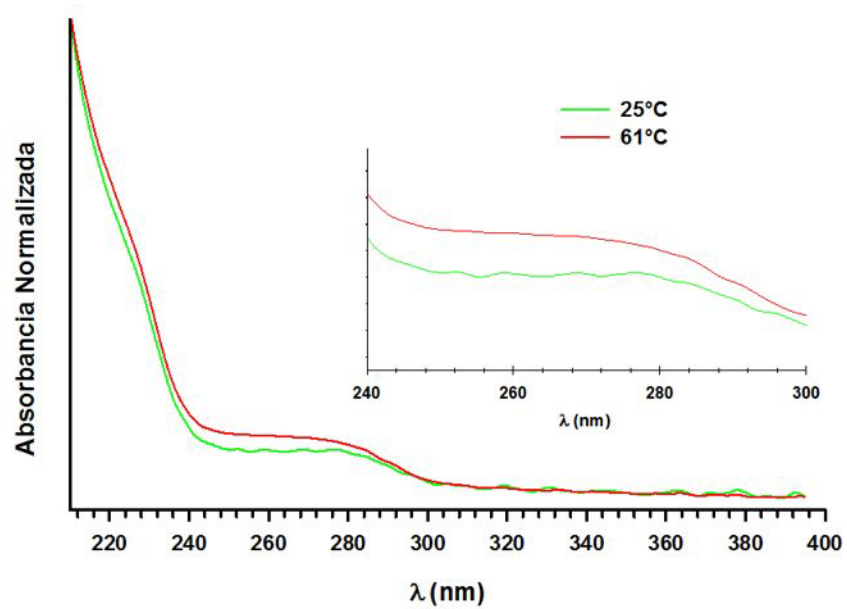
Anexo D

Tinción con plata de un gel de poliacrilamida con muestras de partículas pseudovirales purificadas mediante dos métodos diferentes. A) PPV-VAA purificadas en nuestro laboratorio por intercambio aniónico-gradientes isopícnicos en iodixanol. B) PPV-VAA purificadas por intercambio catiónico-interacción hidrofóbica, donadas por el Dr Amine Kamen (Biotechnology Research Institute, Montreal, Canadá).



Anexo E

Eespectros de absorción de muestras de PPV-VAA a dos temperaturas de incubación diferentes.



EFFECTO DE LA DENSIDAD CELULAR Y LA MULTIPLICIDAD DE INFECCIÓN SOBRE LA PRODUCCIÓN DE BACULOVIRUS RECOMBINANTES EN CULTIVOS DE CÉLULAS DE INSECTO

Cuitláhuac Chávez-Peña^a, Neydeli Adriana Ayala-Mendivil^b,
Octavio Tonatiuh Ramírez^a y Laura A. Palomares^{a*}

^aInstituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México.
Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, Cuernavaca, Morelos, México, C.P. 62210.

^bInstituto Tecnológico de Sonora. 5 de Febrero, no.818 Sur, Col. Centro,
Ciudad Obregón, Sonora, México. *E-mail: laura@ibt.unam.mx

RESUMEN

El sistema células de insecto-baculovirus ha demostrado ser un sistema útil y versátil para la producción de proteínas recombinantes. Consiste en la infección de células de insecto con un baculovirus recombinante que contiene el gen de la proteína de interés. Una de las principales limitantes del sistema es obtener resguardos virales con alto contenido de partículas virales infecciosas (unidades formadoras de placa, ufp). En este trabajo se evaluó el efecto de la multiplicidad de infección (MDI) y la concentración celular al momento de la infección (CCI) en la amplificación de un baculovirus recombinante. Se evaluaron combinaciones de MDI de 0.1 y 1 ufp/célula con CCI de 1 y 2 x10⁶ cél/mL. Se siguieron las cinéticas de crecimiento de las células infectadas, la concentración de proteína total y de la proteína gp64 en el sobrenadante de los cultivos y los títulos virales al momento de la cosecha. Se encontró que una MDI de 0.1 ufp/cél y una concentración celular de 1x10⁶ cél/mL resultaron en el mayor título viral, 3.8 ± 2 x10⁸ ufp/mL. Los mayores títulos virales estuvieron acompañados por un menor crecimiento celular. Los resultados de este trabajo pueden ser utilizados para producir resguardos de baculovirus recombinantes con títulos virales altos y mejorar la eficiencia del proceso.

Palabras Clave: Baculovirus, células de insecto, concentración celular, multiplicidad de infección, títulos virales.

ABSTRACT

The insect cell-baculovirus expression system is versatile and useful for the production of recombinant proteins. It consists in infecting insect cell cultures with a recombinant baculovirus that contains the gene of interest. An important limitation of the system is the limited availability of baculoviral stocks with high titers of infectious particles (plaque forming units, pfu). In this work, the effect of multiplicity of infection (MOI) and cell concentration at the time of infection (CCI) on the yield of baculovirus infectious particles was investigated. Combinations of two values for MOI (0.1 or 1 pfu/cell) and CCI (1 or 2 x10⁶ cel/mL) were tested. Kinetics of cell growth, total protein and gp64 concentrations in the culture supernatant, and the baculovirus titer at the time of harvest were determined. The highest viral titers, 3.8 ± 2 x10⁸ pfu/mL, were obtained in cultures infected at a MOI = 0.1 pfu/cell and a CCI = 1x10⁶ cell/mL. Such cultures had the lowest cell growth after infection. The results obtained in this work can be used for the efficient production of baculovirus stocks with high viral titers.

Key Words: Baculovirus, insect cells, cell concentration, multiplicity of infection, viral titers.

INTRODUCCIÓN

Uno de los sistemas de expresión de proteínas recombinantes que ha tenido mucho éxito para cierto tipo de aplicaciones es el sistema células de insecto-baculovirus (SCI-B). Específicamente, el SCI-B ha sido utilizado para la producción de proteínas virales recombinantes que se ensamblan en partículas similares a los virus nativos, las partículas pseudovirales (PPV). La vacuna Cervarix, aprobada en México para la prevención de cáncer cervicouterino, está basada en PPV del virus de papiloma humano y es producida por el SCI-B. Además, varias vacunas veterinarias son producidas con este sistema. Un gran número de proteínas recombinantes con uso en investigación, desarrollo de biofármacos y diagnóstico han sido expresadas en el SCI-B. El SCI-B se ha utilizado para la producción de vectores recombinantes para terapia génica, como es el caso de vectores de virus adenoasociados^[1], o incluso el propio baculovirus, que es capaz de entregar genes eficientemente a células de mamíferos^[2,3,4]. Otras aplicaciones incluyen la rápida generación de proteínas recombinantes para el desarrollo de terapias personalizadas.

El SCI-B consiste en utilizar un baculovirus, virus con un rango de hospedero restringido a artrópodos, como vector para entregar un gen de interés a células de insecto cultivadas *in vitro*. El baculovirus nucleopoliedrovirus de multicápside de *Autographa californica* (AcMNPV) es el más utilizado en el SCI-B, por ser capaz de infectar cerca de 30 líneas celulares de insectos^[3]. Su genoma, de 131 kpb, contiene uno de los promotores más fuertes conocidos, el promotor que regula la expresión del gen *polh*, que codifica para la proteína poliedrina. Con el fin de utilizar el baculovirus como vector, se sustituye *polh* por el gen de interés, ya que esta proteína no es necesaria para la replicación viral *in vitro*. La expresión de los genes heterólogos bajo el control del promotor de *polh* permite obtener rendimientos de hasta 50% de proteína recombinante con respecto a la proteína total^[3]. Existen otros promotores de baculovirus con características particulares que son utilizados con menor frecuencia.

La producción de proteínas recombinantes en el SCI-B es un sistema de dos etapas. Inicialmente, se cultivan las células de insecto hasta obtener la concentración celular deseada (concentración celular al tiempo de infección, CCI). Entonces se agrega un volumen del resguardo de baculovirus que contiene la cantidad de partículas infecciosas (unidades formadoras de placa, ufp) necesaria para infectar al cultivo con la multiplicidad de infección (MDI, número de partículas virales infecciosas agregadas por cada célula en el cultivo) deseada. El diseño de estrategias de producción de proteínas recombinantes en el SCI-B se basa en la manipulación de la CCI, la MDI y el tiempo de cosecha. Estas variables están interrelacionadas, se manipulan fácilmente y tienen un impacto significativo en los rendimientos obtenidos^[5,6,7].

La MDI utilizada determina la fracción de la población celular que es infectada al inicio del cultivo. Esta relación puede ser modelada mediante la distribución de Poisson^[8] (Figura 1). A MDI mayores de 5 ufp/cél, el 100 % de la población es infectado con el baculovirus recombinante adicionado al cultivo. En consecuencia, el virus toma control de la célula, promueve la síntesis de sus proteínas y evita la síntesis de las proteínas celulares^[3,9]. Cuando se utilizan MDI menores que 5 ufp/cél, sólo una fracción de la población es infectada inicialmente. Las células infectadas producen nueva progenie viral entre las 12 y las 20 horas postinfección^[9]. La progenie viral es la que infecta el resto del cultivo y la que al final del cultivo constituye el nuevo resguardo viral amplificado. La producción de baculovirus recombinantes conlleva la síntesis de altas cantidades de ADN viral, además de las proteínas virales. Esto impone una alta carga metabólica a la célula, la que se ve reflejada por una alta velocidad de consumo de oxígeno y de otros nutrientes^[10,11]. Mientras mayor sea la CCI utilizada, mayor será el consumo de nutrientes y oxígeno del cultivo. Altas CCI pueden resultar en un insuficiente abastecimiento de nutrientes y oxígeno, mientras que bajas CCI pueden resultar en concentraciones celulares demasiado bajas, ya que las células infectadas no continúan en crecimiento. Ambos escenarios resultan en una baja productividad de baculovirus recombinantes.

Uno de los principales factores limitantes en el uso del SCI-B es la disponibilidad del resguardo de baculovirus recombinante, el que es producido en cultivos anteriores de células de insecto^[12,13]. Mientras varios trabajos han estudiado el efecto de las condiciones de infección sobre la producción de proteína recombinante, pocos trabajos han estudiado la producción de baculovirus recombinantes. Destacan los trabajos de Tsai *et al.*^[13] y de Carinhas *et al.*^[4], quienes determinaron el papel de la MDI sobre la producción de baculovirus recombinante para la entrega de genes a células de mamífero y no para la producción de proteínas recombinantes en células de insecto. Ambos trabajos utilizaron un baculovirus recombinante que expresa la proteína verde fluorescente (EGFP, por sus siglas en inglés). Carinhas *et al.*^[4] utilizaron MDI muy altas, 30 ufp/cél, las que no son adecuadas para la expansión de resguardos virales por la aparición de partículas virales defectuosas, mientras que Tsai *et al.*^[13] no evaluaron diferentes CCI. En este trabajo evaluamos el efecto de la MDI y la CCI en la expansión de un baculovirus recombinante, que será utilizado como resguardo viral para la producción de proteínas recombinantes por el SCI-B.

MATERIALES Y MÉTODOS

Línea celular y baculovirus recombinante

Se utilizó la línea celular de insecto Sf9, proveniente de *Spodoptera frugiperda*, cultivada en medio libre de suero Sf900II (Invitrogen). El mantenimiento de rutina de las células se hizo en matraces agitados de 250 mL con un volumen de trabajo de 40 mL y una agitación de 110 rpm, sub-cultivando las

células cada 72 horas con inóculos de $5-7 \times 10^5$ células/mL. Para las infecciones se utilizó un resguardo viral del baculovirus recombinante BacCap desarrollado por Urabe *et al.*^[1] Este baculovirus contiene el gen que codifica para las proteínas de la cápside del virus adenoasociado tipo 2.

Diseño experimental

Se evaluó el efecto de la concentración celular al tiempo de la infección (CCI) y multiplicidad de infección (MDI) (variables independientes) sobre la producción de proteína gp64 de baculovirus y el título viral (variables dependientes) en cultivos de células Sf9. Para ambas variables independientes se seleccionaron dos niveles: 1×10^6 y 2×10^6 células/mL para la concentración celular y 0.1 y 1.0 unidades formadoras de placa (ufp)/célula para las multiplicidades de infección. Se hicieron experimentos por duplicado para cada una de las 4 combinaciones posibles (Figura 2). El análisis de resultados se hizo mediante un ANOVA (análisis de varianza) con una confianza del 95 % ($\alpha=0.05$).

Infección de las células con baculovirus recombinantes

A partir de cultivos de células Sf9 en fase exponencial con una viabilidad mayor al 95%, se prepararon cultivos en matraces agitados de 250 mL con un volumen de trabajo de 37 mL a las dos concentraciones celulares a evaluar (3 matraces por concentración). La concentración celular se determinó mediante conteo en cámara de Neubauer y la viabilidad celular mediante la técnica de exclusión de azul de tripano. Los matraces se infectaron a las MDI listadas anteriormente y se utilizó un tercer matraz sin infectar como control. Con el fin de mantener volúmenes similares en todos los cultivos, el volumen del resguardo viral requerido para cada infección fue llevado a 3 mL con medio de cultivo agotado (sobrenadante de un cultivo de células de

insecto de 72 horas de edad). Se utilizó medio agotado para no introducir nutrientes adicionales a los cultivos. Cada 24 horas se tomaron alícuotas de 500 μ L y se determinó la concentración y la viabilidad celular. Las muestras se centrifugaron a 650 g durante 10 minutos a 4°C para separar las células del sobrenadante, estos últimos se almacenaron a 4°C para su posterior análisis.

Cuantificación de proteína total

Se utilizó el método de Bradford con el reactivo de Bio-Rad y el protocolo estándar para placas de 96 pozos descrito por el fabricante. Se preparó una curva estándar de albúmina bovina en un rango de 50 a 500 μ g/mL y diluciones apropiadas de las muestras a analizar. Se colocaron por triplicado 10 μ L de las diluciones de estándar o muestra en placas de 96 pozos y se adicionaron 200 μ L de reactivo de Bradford. Las muestras se incubaron durante 5 minutos y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas. La concentración de proteína se calculó mediante interpolación en la curva estándar.

Contenido relativo de proteína gp64

La proteína gp64 de baculovirus se cuantificó utilizando análisis densitométrico de inmunodetecciones en membrana (Western blot). Se mezclaron 75 μ L de sobrenadante de cultivo con 25 μ L de solución amortiguadora de carga 4X (0.25 mM Tris pH 6.8, 8% SDS, 0.001% azul de bromofenol, 40% glicerol y 20% β -mercaptoetanol) y se hirvieron 10 min. Se cargaron 30 mL de muestra por pozo y se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 12%, usando una solución amortiguadora de Tris-glicina (24.8 mM Tris, 192 mM glicina, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, pH 8.8). Posteriormente se realizó la transferencia a membranas de nitrocelulosa (Millipore, USA), en un sistema semi-seco (Owl Scientific) a 400 mA durante 2 h, con soluciones amortiguadora de Tris-glicina. Las membranas se incubaron 1 h en solución de bloqueo (PBS-Tween 20 al 0.1%, con leche descremada al 5%). Se llevaron a cabo lavados con una solución amortiguadora de fosfatos con Tween 20 al 0.1% (PBST). Para la detección de la proteína gp64 de baculovirus, las membranas se incubaron durante una hora con el anticuerpo monoclonal FastPlax (Novagen) a una dilución 1:10,000. Como anticuerpo secundario se utilizó un anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa preparado a una dilución 1:2,500. Las membranas se revelaron usando una solución de carbazol. Se realizó un análisis densitométrico de las membranas de Western blot con la ayuda del programa ImageJ v. 1.41 (Wayne Rasband, National Institutes of Health, EUA). Los resultados se reportan normalizados con respecto a una muestra control de gp64, a cuya área por intensidad se le dio el valor de 1 unidad/mL.

Determinación de títulos virales

Se determinó el título viral (unidades formadoras de placa, ufp/mL) de los sobrenadantes colectados a las 120 horas post infección. Se utilizó el método propuesto por Mena *et al.*^[14] En placas de 96 pozos (2 cajas por muestra a titular) se sembraron 5×10^3 células/pozo en 50 μ L de medio SF900-II. Se prepararon

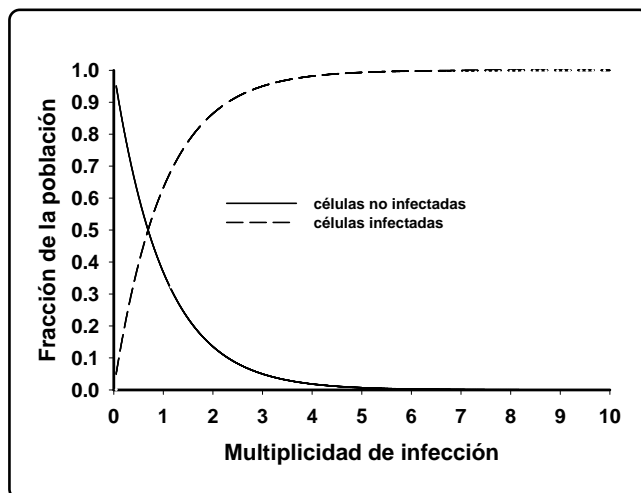


Figura 1. Distribución de Poisson que muestra el efecto de la multiplicidad de infección sobre la fracción de la población de células de insecto infectada durante la infección primaria.

diluciones seriadas (10^0 a 10^{-10}) del resguardo viral a titular y se agregaron 10 μL /por pozo usando 16 pozos por dilución y 16 pozos como control negativo, a los que se les adicionó medio de cultivo. Las placas se incubaron a 27°C en un ambiente húmedo durante 6 días. Al término del periodo de incubación se agregaron 10 μL /pozo de una solución (5 mg/mL) 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 dos horas a temperatura ambiente en agitación moderada, se centrifugaron por 10 minutos a 2,000 g y se descartó el sobrenadante. Los cristales formados fueron solubilizados con 50 μL /pozo de dimetil sulfóxido (DMSO). Se midió la absorbancia a 570 nm usando un lector de microplacas (modelo 550; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Los datos de absorbancia y dilución viral se ajustaron a un modelo logístico (Ecuación 1) usando el programa Sigmaplot 11.0.

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

donde Y representa la absorbancia, D la dilución viral, Y_0 la absorbancia mínima (que corresponde a la viabilidad mínima detectada), a es la absorbancia máxima, b es la pendiente de la curva y D_0 es la dilución a la cual la respuesta fue del 50%. A partir de este valor se calculó el título viral como se describe en Mena *et al.*^[14]

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El diseño experimental generó un total de cuatro combinaciones de las variables a evaluar, según se describe en la Figura 2. Una vez infectados los cultivos, se colectaron muestras cada 24 horas y se realizaron análisis para detectar diferencias en el crecimiento celular, producción de proteína o generación de baculovirus ocasionadas por las condiciones de cultivo e infección empleadas. En la Figura 3 se muestran las cinéticas de crecimiento de los cultivos. La concentración celular máxima alcanzada fue menor en los cultivos infectados con la mayor MDI. El incremento de concentración celular a las 120 horas en relación a las condiciones iniciales fue de aproximadamente dos veces para los cultivos infectados con 0.1 ufp/cél y de 1.5 veces para los cultivos infectados a 1.0 ufp/cél (Figura 3). En contraste,

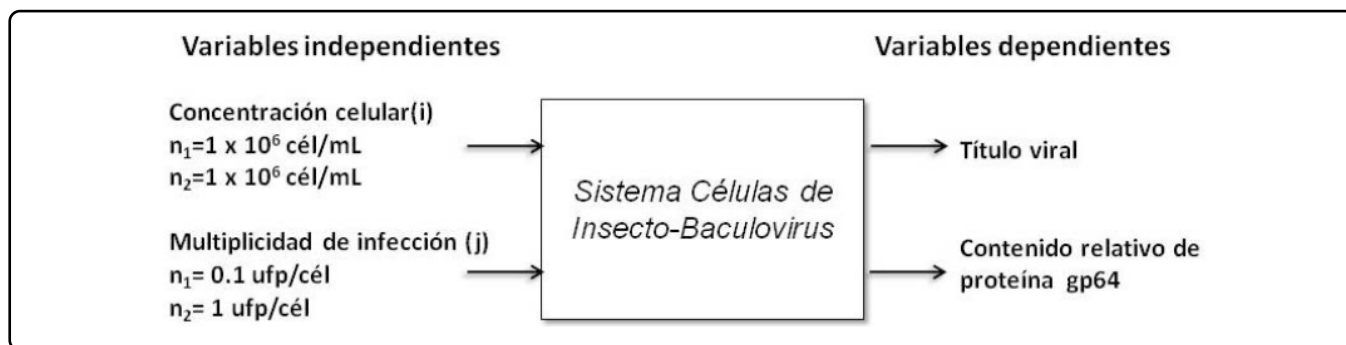


Figura 2. Diseño experimental.

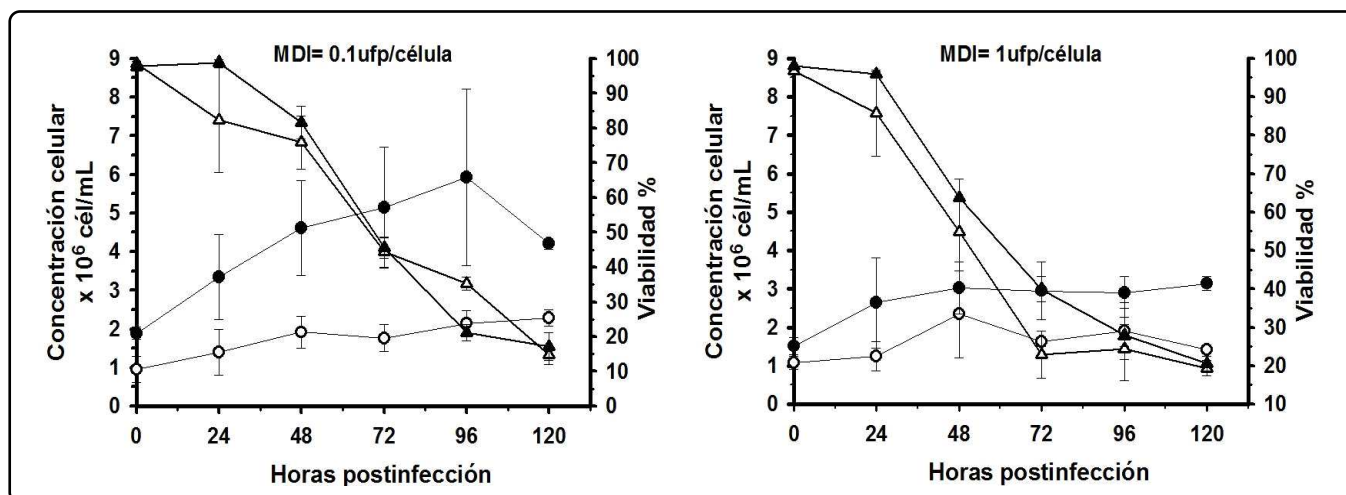


Figura 3. Cinéticas de crecimiento y viabilidad de cultivos de células de insecto Sf9 infectados a dos concentraciones celulares iniciales, 1×10^6 (símbolos vacíos) o 2×10^6 (símbolos llenos) cél/mL, y con dos multiplicidades de infección (MDI). Círculos, concentración celular. Triángulos, viabilidad.

los cultivos control no infectados duplicaron su concentración celular aproximadamente cada 24 horas (datos no mostrados), lo que indica que fue la infección con baculovirus la que provocó la disminución en el crecimiento celular. Además, los cultivos infectados a la mayor MDI mostraron un rápido descenso de la viabilidad a partir de las 24 horas postinfección, mientras que el descenso inició a las 48 horas en los cultivos infectados a la MDI menor. Las viabilidades observadas al final de los cultivos fueron similares en todas las condiciones experimentales evaluadas (Figura 3). El limitado crecimiento y la disminución de la viabilidad en cultivos de células de insecto infectados con baculovirus recombinantes han sido observados por varios grupos de investigación y son provocados por el control que el baculovirus ejerce sobre las células al promover la síntesis de las proteínas baculovirales a expensas de las celulares^[3,9]. El menor crecimiento observado en los cultivos infectados a mayor MDI se debe a la infección de un mayor número de células en el cultivo, las que dejan de crecer (Figura 1).

Las muestras de los cultivos se procesaron para obtener el sobrenadante, que contiene las partículas virales infecciosas y constituye un potencial resguardo viral. Se determinó el contenido relativo de gp64 de baculovirus mediante Western blot (Figuras 4 y 5) y la concentración de proteína total en estas muestras (Figura 5). La concentración de proteína total a T_0 fue de $48.2 \pm 6 \mu\text{g/mL}$ para todos los cultivos y en todos los experimentos la concentración de proteína más alta se alcanzó entre las 96 y las 120 horas postinfección. La concentración de proteína total en el sobrenadante a lo largo del cultivo se vio afectada tanto por la CCI como por la MDI utilizada. Se detectó una mayor concentración de proteína en los sobrenadantes de cultivos a CCI alta, mientras que la concentración de proteína

en los sobrenadantes de cultivos infectados a baja MDI fue mayor que la de cultivos infectados a alta MDI. Los cultivos con una CCI alta e infectados a baja MDI alcanzaron la mayor concentración de proteína total, $1053 \pm 190 \mu\text{g/mL}$ (Figura 5a), mientras que los cultivos con una CCI baja e infectados a una alta MDI llegaron a una concentración de tan sólo $482 \pm 132 \mu\text{g/mL}$ (Figura 5b). Esto es resultado de una mayor concentración celular en los cultivos a alta CCI y baja MDI. Sin embargo, es necesario resaltar que la concentración de proteína en el sobrenadante por célula fue mayor en los cultivos infectados a una CCI de 1×10^6 cél/mL. Este comportamiento podría ser el resultado de una limitación de nutrientes u oxígeno en los cultivos a altas CCI, como ha sido observado anteriormente^[4,10,11].

La proteína gp64 está presente en la membrana de la progenie viral, por lo que podría ser útil para hacer un estimado de la progenie viral producida sin necesidad de realizar la titulación de los baculovirus, proceso que dura varios días. Se midió gp64 con el fin de evaluar si su concentración y los títulos virales correlacionaban. Los perfiles de producción de gp64 fueron similares para todas las condiciones experimentales ensayadas. Se observó proteólisis en gp64 conforme aumentó el tiempo postinfección (Figura 4), fenómeno previamente reportado por otros autores^[15]. En la Figura 5 (c y d) se observa que en todos los casos el mayor incremento en la concentración de gp64 se dio entre las 24 y las 48 horas postinfección, alcanzando una concentración máxima entre las 72 y las 96 horas. Únicamente hubo diferencia a las 24 horas postinfección, cuando la concentración relativa de gp64 fue 3 veces mayor en los cultivos infectados a una alta MDI (Figura 5b), en comparación con los que fueron infectados a una baja MDI (Figura 5a). La concentración relativa máxima fue de 1.6 ± 0.1 unidades/mL, la que se obtuvo a las 96 horas postinfección en el cultivo infectado con 1 ufp/cél a una CCI de 1×10^6 cél/mL. Por otro lado, las condiciones que resultaron en una menor producción de gp64 (1.4 ± 0.1 unidades/mL) fueron una MDI de 1 ufp/cél a una CCI de 2×10^6 cél/mL.

Una vez transcurridas 120 horas desde la infección, se cosecharon los cultivos y se procesaron como se describe en materiales y métodos para la obtención de los sobrenadantes. La cosecha se realizó a las 120 horas postinfección, ya que éste es el tiempo sugerido para cosechar durante la amplificación de resguardos virales^[9]. Se determinó el título viral en los sobrenadantes, el cual es una medición de la cantidad de baculovirus infecciosos presentes. Los títulos virales obtenidos se listan en la Tabla I y se muestran gráficamente en la Figura 6. El mayor título viral se obtuvo en los cultivos infectados a bajas CCI y MDI. Además, se observó que mientras a la MDI menor la concentración celular tuvo un importante efecto sobre el rendimiento de baculovirus, a alta MDI la CCI no tuvo efecto alguno en la producción de baculovirus

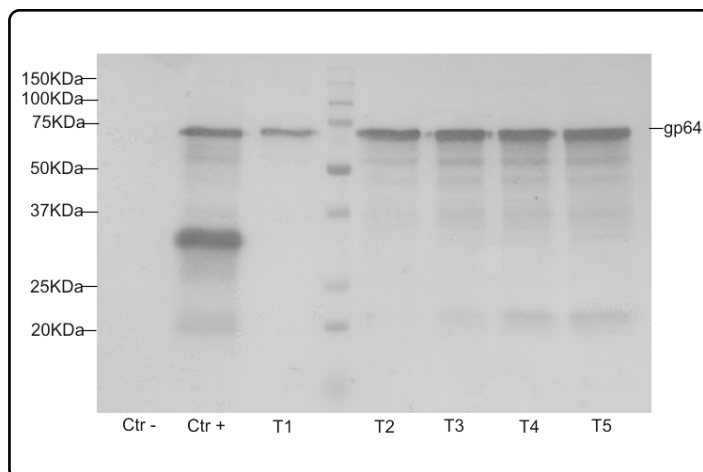


Figura 4. Inmunodetección en membrana de la proteína gp64 de la envoltura del baculovirus. La banda detectada entre 75 y 50 KDa corresponde a la proteína gp64 intacta. El resto de las bandas observadas corresponden a productos de degradación que conservan el epítipo del anticuerpo monoclonal utilizado. (Ctr -) control negativo, (Ctr +) control positivo, (T0, T1, T2, T3, T4) Sobrenadantes de cultivo de las 24, 48, 72, 96 y 120 horas postinfección.

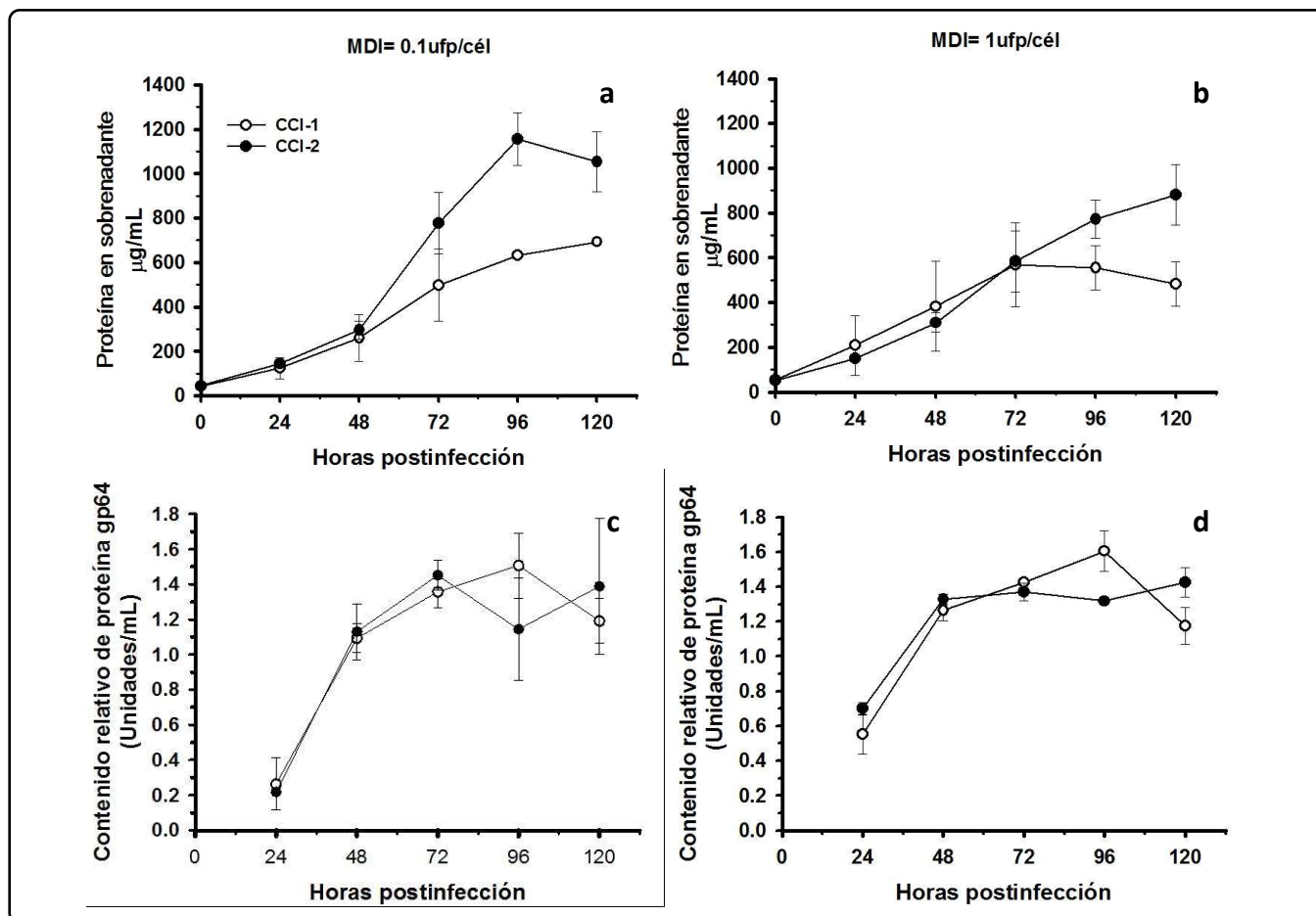


Figura 5. Perfiles de producción de proteína total (a, b) y contenido de proteína gp64 (c, d) en cultivos infectados a diferentes CCI y MDI.

CCI, x10 ⁶ cél/mL	Título viral, x10 ⁸ ufp/mL	
	MDI 0.1 ufp/cél	MDI 1 ufp/cél
1	3.8±2.0	1.6±0.7
2	1.7±0.03	1.1±0.3
	Título viral específico, ufp/cél ^a	
1	153.1±82.4	88.9±63.4
2	29.9±9.7	32.7±5.0

a. Se dividió el título viral entre la concentración celular máxima alcanzada en cada cultivo.

Tabla 1. Títulos virales obtenidos a 120 horas postinfección.

infecciosos. Sin embargo, un análisis de varianza de los datos no mostró un efecto significativo de ninguno de los dos parámetros evaluados en el rendimiento volumétrico de partículas infecciosas, dada la alta desviación estándar obtenida en los títulos virales. Cabe destacar que, aunque altos, los coeficientes de variación obtenidos en este trabajo fueron mucho menores

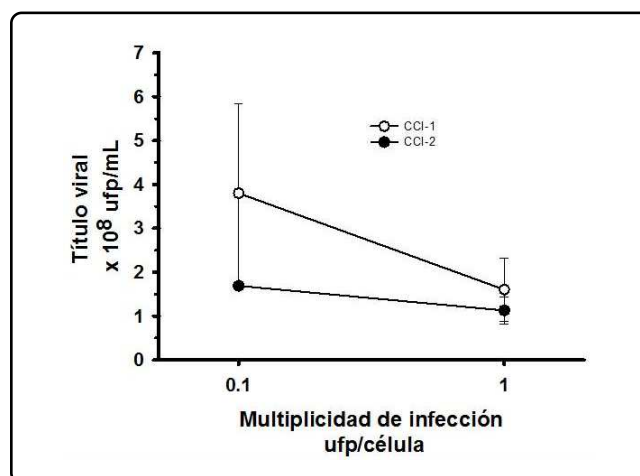


Figura 6. Efecto de la MDI y la CCI sobre la producción de baculovirus.

que aquellos comúnmente obtenidos utilizando otras técnicas de titulación de virus^[16]. Con el fin de evaluar si los cambios observados en el título viral se debían a una mayor productividad

de cada célula en el cultivo o a diferencias en la concentración celular, se calculó el rendimiento de baculovirus por célula en el cultivo (Tabla I). Se observó que las células en los cultivos infectados a una CCI menor produjeron entre 5 y 3 veces más baculovirus infecciosos que las células infectadas a alta CCI. Los cultivos con mayor rendimiento de baculovirus por célula fueron aquéllos infectados a una baja MDI y CCI, los que también tuvieron el mayor rendimiento volumétrico. La MDI tampoco tuvo un efecto en el rendimiento específico de baculovirus a altas CCI. Sin embargo, hubo una relación inversa entre la concentración celular máxima alcanzada y los títulos virales específicos obtenidos.

El efecto de la MDI y CCI en los rendimientos de baculovirus infecciosos no concuerda con reportes anteriores sobre la productividad de proteína recombinante por el SCIB, donde se ha encontrado la máxima productividad en combinaciones de bajas CCI con bajas MDI o de altas CCI con altas MDI. El trabajo más cercano al presentado aquí es el de Carinhas *et al.*^[4] Sin embargo, las estrategias propuestas en ambos trabajos difieren de forma importante. Ellos utilizaron MDI substancialmente mayores. La infección de cultivos a una CCI de 2×10^6 cél/mL con una MDI de 30 ufp/cél les permitió alcanzar títulos virales con un orden de magnitud mayor a los alcanzados en este trabajo. Sin embargo, el uso de multiplicidades tan altas está asociado con la aparición de partículas virales defectuosas, lo cual resulta en la disminución de la producción del producto recombinante de interés^[17]. Además, el uso de MDI tan altas no es práctico para amplificar resguardos virales, pues requiere de grandes volúmenes del resguardo viral inicial, el que normalmente sólo está disponible en pocas cantidades. Trabajos anteriores han mostrado que una alta productividad de proteína recombinante no necesariamente está acompañada de una alta productividad de baculovirus^[18]. A excepción de la concentración celular máxima, no se encontró relación entre alguno de los parámetros medidos y los rendimientos volumétricos o específicos de baculovirus.

CONCLUSIONES

En este trabajo se identificaron las condiciones de infección que resultan en los mayores rendimientos de baculovirus infecciosos producidos por células de insecto. Las condiciones con mayores rendimientos específicos y volumétricos fueron una MDI de 0.1 ufp/cél a una CCI de 1×10^6 cél/mL. En estas condiciones se obtuvieron títulos virales de $3.8 \pm 2 \times 10^8$ ufp/mL y rendimientos específicos de 153 ± 82 ufp/cél. La obtención de los mayores títulos virales estuvo acompañada de un menor crecimiento celular después de la infección. Los resultados de este trabajo pueden ser utilizados para producir resguardos de baculovirus recombinantes con títulos virales mayores y mejorar la eficiencia del proceso.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado por el Fondo CONACyT-Salud

126663 y PAPIIT-UNAM proyectos IN223210 y 224409. Se contó con el apoyo técnico de Vanessa Hernández y Ana Ruth Pastor. Cuitláhuac Chávez agradece el apoyo del CONACyT durante sus estudios de posgrado (becario 269049).

REFERENCIAS

1. Urabe, M., Ding, C. & Kotin, R.M. Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type 2 vectors. *Human Gene Therapy* **13**, 1935-1943 (2002).
2. Kost, T.A. & Condreay, J.P. Recombinant baculoviruses as mammalian cell gene-delivery vectors. *Trends in Biotechnology* **20**, 173-180 (2002).
3. Palomares, L.A., Estrada-Mondaca, S. & Ramírez, O.T. "Principles and Applications of the Insect-Cell-Baculovirus Expression Vector System" en *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Applications* (ed. Ozturk, S. & W.S. Hu) 627-692 (Taylor and Francis, Nueva York, 2006).
4. Carinhas, N. *et al.* Baculovirus production for gene therapy: the role of cell density, multiplicity of infection and medium exchange. *Applied Microbiology and Biotechnology* **81**, 1041-1049 (2009).
5. Radford, M.K. *et al.* The indirect effects of multiplicity of infection on baculovirus expressed proteins in insect cells: secreted and non secreted products. *Cytotechnology* **24**, 73-81 (1997).
6. Hu, Y.C. & Bentley, W.E. 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**, 104-119 (2001).
7. Maranga, L., Cruz, P.E., Aunins, J.G. & Carrondo, M.J. Production of core and virus like particles with baculovirus infected cells. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* **74**, 183-206 (2002).
8. Mena, J.A., Ramírez, O.T. & Palomares, L.A. Population kinetics during simultaneous infection of insect cells with two recombinant baculoviruses for the production of virus-like particles. *BMC Biotechnology* **7**, 39 (2007).
9. O'Reilly, D.R., Miller, L.K. & Luckow, V.A. *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual* (Oxford University Press, New York, 1994).
10. Palomares, L.A., López, S. & Ramírez, O.T. Utilization of oxygen uptake rate to assess the role of glucose and glutamine in the metabolism of insect cell cultures. *Biochemical Engineering Journal* **19**, 87-93 (2004).
11. Elias, C.B., Zeiser, A., Bédard, C. & Kamen, A.A. Enhanced growth of Sf-9 cells to a maximum density of 5.2×10^7 cells per mL and production of b-galactosidase at high cell density by fed batch culture. *Biotechnology and Bioengineering* **68**, 381-388 (2000).
12. Ross, O.H., McCabe, D.D., Hollis, G.F. & Rosenfeld, S.A. Methods for baculovirus amplification- Application to large scale recombinant protein production in insect cells. *Biotechnology Techniques* **12**, 463-465 (1998).
13. Tsai, C.T. *et al.* Factors influencing the production and storage of baculovirus for gene delivery: An alternative perspective from the transducing titer assay. *Enzyme and Microbial Technology* **40**, 1345-1351 (2007).
14. Mena, J.A., Ramírez, O.T. & Palomares, L.A. Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *Biotechniques* **34**, 260-263 (2003).

15. Oomens, A.G.P., Monsma, S.A. & Blissard, G.W. The baculovirus gp64 envelope fusion protein: Synthesis, oligomerization and processing. *Virology* **209**, 592-603 (1995).
16. Roldao, A., Oliveira, R., Carrondo, M.J.T. & Alves, P.M. Error assessment in recombinant baculovirus titration: Evaluation of different methods. *Journal of Virological Methods* **159**, 69-80 (2009).
17. Wickham, T.J. *et al.* Baculovirus defective interfering particles are responsible for variations in recombinant protein production as a function of multiplicity of infection. *Biotechnology Letters* **13(7)**, 483-488 (1991).
18. Palomares, L.A., González, M. & Ramírez, O.T. Evidence of Pluronic F-68 direct interaction with insect cells: Impact on shear protection, recombinant protein and baculovirus production. *Enzyme and Microbial Technology* **26**, 324-331 (2000).