



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA**

**TITULACIÓN DEL VECTOR LENTIVIRAL DE GFP  
UTILIZADO COMO REPORTERO DE EXPRESIÓN  
EN LOS ENSAYOS DE REPROGRAMACIÓN  
DE CÉLULAS HUMANAS**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE LICENCIADO EN BIOLOGÍA  
PRESENTA: **GERMÁN ATZIN MORA ROLDÁN**

DIRECTOR DE TESIS. DOCTOR KARLEN GAZARIAN

LOS REYES IZTACALA, ESTADO DE MÉXICO, 2013

# TITULACIÓN DEL VECTOR LENTIVIRAL DE GFP UTILIZADO COMO REPORTERO DE EXPRESIÓN EN LOS ENSAYOS DE REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS HUMANAS.

## Reconocimientos

Esta tesis de licenciatura se realizó bajo la dirección del Dr. Karlen Gazarian y bajo la asesoría del M. en C. Ricardo Cevallos Guerra, en el laboratorio de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental C-134 del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se reconoce la colaboración del Dr. Elías Piedra Ibarra y del Dr. Erasmo Negrete Abascal en las observaciones realizadas para la presentación final del presente.

El comité de evaluación al que estuvo sometida la defensa de esta tesis estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Sergio Vaca Pacheco	Unidad de Morfofisiología y Función, FESI UNAM
Vocal	Dr. Elías Piedra Ibarra	Unidad de Biotecnología y prototipos, FESI UNAM
Secretario	Dr. Karlen Gazarian	Instituto de Investigaciones Biomédicas, IBB UNAM
Suplente	Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz	Unidad de Biotecnología y Prototipos, FESI UNAM
Suplente	Dr. Erasmo Negrete Abascal	Unidad de Morfofisiología y Función, FESI UNAM

**Los Reyes Iztacala, Estado de México, 2013**

## ABREVIATURAS

---

<b>AIDS</b>	Acquired Immunodeficiency Syndrome
<b>BSA</b>	Bovine Serum Albumin, Albumina de suero Fetal
<b>CA</b>	Cápside
<b>CMV</b>	Citomegalovirus
<b>COS</b>	CV-1 (simian) in Origin, portador del material genético de SV40
<b>DMEM</b>	Dulbecco's Modified Eagle Medium
<b>DPCS</b>	Dental Pulp Stem Cells
<b>FACS</b>	Fluorescence-activated cell sorting
<b>FBS</b>	Fetal Bovine Serum
<b>GFP</b>	Green Fluorescent Protein
<b>HBS</b>	Hank's Balanced Salts
<b>HEK (293T)</b>	Human Embryonic Kidney
<b>HeLa</b>	Henrietta Lacks, Línea celular
<b>HEPES</b>	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
<b>HIV-1</b>	Human Immunodeficiency Virus type 1
<b>HSC</b>	Hematopoietic Stem Cell
<b>IN</b>	Integrasa
<b>IPSC</b>	Induced Pluripotent Stem Cell
<b>LTR</b>	Long Terminal Repeat
<b>MA</b>	Matriz
<b>MOI</b>	Multiplicity of Infection
<b>NC</b>	Núcleo-cápside
<b>OKSIM</b>	Oct4, KLF4, Sox2, c-Myc
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PBS</b>	Primer Binding Site
<b>PCR</b>	Polimerase Chain Reaction
<b>PEG</b>	Polietilenglicol
<b>PIC</b>	Pre-integration Complex, Complejo de pre-integración
<b>RNA</b>	Ribonucleic Acid
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute, Medio de cultivo celular
<b>RRE</b>	Rev Response Element, Elemento de respuesta a Rev
<b>RT</b>	Transcriptasa Inversa
<b>RTC</b>	Complejo de Reverso-Transcripción
<b>SIN</b>	Self Inactivating
<b>SV-40</b>	virus 40 vacuolado del simio
<b>VSV</b>	Vesicular Stomatitis Virus

# ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1 LENTIVIRUS: GENERALIDADES.....	1
1.2 VISIÓN GENERAL DEL CICLO REPRODUCTIVO .....	2
1.2.1 INTERACCIÓN LENTIVIRUS-CÉLULA HUÉSPED .....	4
1.2.2 REVERSO TRANSCRIPCIÓN .....	5
1.2.3 INTEGRACIÓN: COMPLEJO DE PRE-INTEGRACIÓN Y TRANSLOCACIÓN NUCLEAR.....	7
1.3 GENOMA LENTIVIRAL.....	8
1.3.1 DOMINIOS PRINCIPALES.....	10
1.3.2 ENV .....	10
1.3.3 GAG.....	11
1.3.4 POL.....	11
1.4 LOS LENTIVIRUS COMO HERRAMIENTAS .....	12
1.4.1 ESTRATEGIAS Y MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GÉNICA.....	12
1.5 FABRICANDO UN VECTOR LENTIVIRAL.....	14
1.6 TITULACIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES: IMPORTANCIA DE LA TITULACIÓN Y TÉCNICAS DE TITULACIÓN EXISTENTES .....	21
HIPÓTESIS .....	24
2. METODOLOGÍA .....	25
3. RESULTADOS .....	39
4. DISCUSIÓN.....	60
5. CONCLUSIONES .....	71
6. ANEXO .....	72
7. BIBLIOGRAFIA REFERENCIADA .....	81
8. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA.....	88

# 1. INTRODUCCIÓN

---

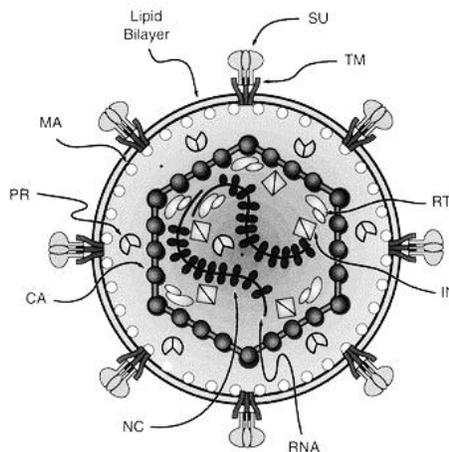
## 1.1 LENTIVIRUS: GENERALIDADES

Se denomina lentivirus al género de agentes microscópicos infecciosos, pertenecientes a la subfamilia *Orthoretrovirinae*, familia *Retroviridae* (**Coffin, 1997**), los agentes agrupados dentro de este género se caracterizan principalmente por un periodo lento de incubación dentro de su ciclo de vida (desde meses hasta años) (**Federico, 2003**). Se caracterizan también por la presencia de dos copias codificantes de RNA monocatenario retro-transcrito. Mediante una enzima conocida como *integrasa* los lentivirus son capaces de insertar e integrar su información genética a la célula hospedadora (**Zhao & Lever, 2007**). Pueden ser desde esféricos hasta pleomorfos y su diámetro oscila entre los 20 y 100 nanómetros. Los lentivirus (junto con otros retrovirus) estructuralmente se distinguen por contar con una estructura flexible conocida como *envoltura*, exclusiva de los virus animales y que deriva directamente de la membrana plasmática de la célula hospedadora, sin ser ésta su único componente, ya que al exterior presenta glicoproteínas que son codificadas por el genoma lentiviral, estas proteínas se agrupan para formar espinas o espículas que permiten la entrada del virus a la célula huésped, pues sirven para identificar y unirse a sitios receptores de la membrana de la célula hospedadora (**Yu et. al., 1996**). Contendida dentro de la *envoltura* se encuentra la *cápside*, una estructura con forma de icosaédro, que envuelve al material genético viral, el término *nucleocápside* se refiere al conjunto de *material genético y cápside*, esta última se encuentra formada por monómeros de proteínas, llamados capsómeros, (**Lata et. al., 2000**). Los lentivirus son considerados agentes causales de síndromes de inmunodeficiencia adquirida en una gran cantidad de especies animales, se han aislado lentivirus específicos de: primates, gatos, caballos<sup>1</sup>, ovejas y cabras (**Federico, 2003**). El virus de Inmunodeficiencia Humana del tipo uno, HIV-1 se ha convertido en el

---

<sup>1</sup> El primer lentivirus conocido por el hombre fue aislado en 1904 de un caballo con anemia hemolítica, fue nombrado: Virus de la anemia infecciosa equina (EIAV). Desde entonces otros lentivirus han sido aislados de otras especies de mamíferos (virus visna-maedi de oveja; virus de la encefalitis/artritis caprina, CAEV; virus de inmunodeficiencia bovina, BIV) felinos (Virus de inmunodeficiencia felina, FIV) y primates (virus de inmunodeficiencia en simios, SIV). **Tang et al., 1999, Lentivirus Replication and Regulation, Annual Review of Genetics Vol. 33: 133-170**

representante más estudiado de este grupo, pues se trata del agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (AIDS), pandemia que hasta el año 2010 afecta a 34 millones de personas en el mundo (**OMS, 2010**). Este hecho ha estimulado investigaciones convirtiéndolo en el caso de estudio prototípico, del cual se han delimitado con detalle las principales características del género, su ciclo de vida, así como los principales componentes del genoma lentiviral (**Narayan & Clements, 1986**).



**Fig. 1 Corte transversal esquemático de una partícula lentiviral.** La envoltura es formada por una capa lipídica derivada de la célula, dentro de la cual las proteínas que son codificadas por la región *env* del genoma son insertadas. Estas consisten en componentes transmembrana (TM) y superficiales (SU) unidos entre sí por enlaces disulfuro. Al interior, proteínas estructurales no glucosiladas son codificadas por la región *gag* del genoma, la proteína de Matriz (MA), la Cápside (CA) y la Nucleocápside (NC), los principales productos de la región codificante *pol* son la transcriptasa reversa (RT) y la integrasa (IN). Tomado de **Coffin, 1997**

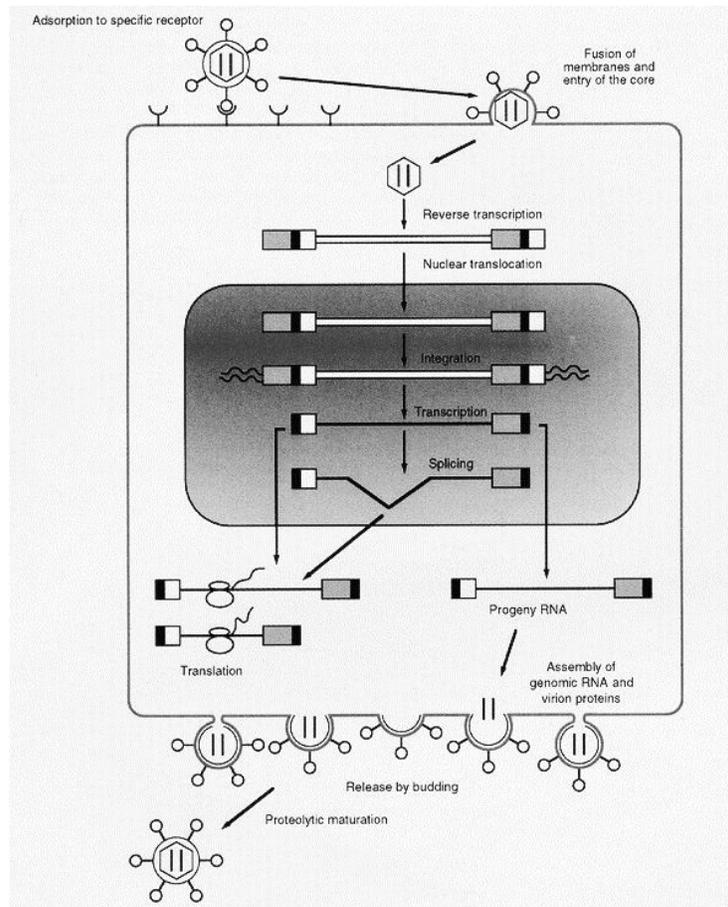
## 1.2 VISIÓN GENERAL DEL CICLO REPRODUCTIVO.

El ciclo de vida de un lentivirus, sigue el patrón general de los virus de la familia *retroviridae*. El ciclo comienza cuando una partícula infecciosa morfológicamente completa conocida como *virión*, entra a la célula hospedadora a través de la unión de las glicoproteínas de superficie a receptores específicos de membrana, lo que conlleva a la fusión de la membrana con el *virión*. La interacción del virus con las superficies celulares es altamente específica y constituye el principal determinante del rango de acción de un lentivirus. Después de entrar en la célula el genoma de RNA aun contenido en la cápside se asocia con la transcriptasa reversa y es copiado a DNA de doble cadena, esta transcripción involucra dos transferencias de sitio de la transcriptasa reversa sobre la molécula

de RNA que a la vez sirve de molde. Como resultado de estas transferencias son duplicadas dos secuencias localizadas en los extremos 5' y 3' encontradas en el anterior genoma de RNA; Las secuencias copiadas funcionan como reguladoras de integración y expresión génica y se componen de un solo patrón de nucleótidos repetido millones de veces en lo que se denomina una repetición terminal larga (LTR, long terminal repeat), una vez copiadas se colocan en ambos extremos del recién generado DNA viral (**Coffin, 1994**).

La reverso-transcripción se lleva a cabo en el citoplasma; el DNA viral es entonces llevado al núcleo donde una copia del genoma lentiviral es insertada en el DNA cromosomal con ayuda de una enzima denominada integrasa para formar un DNA estable que se conoce como *provirus*. La integración no cambia el orden de las secuencias del virus, LTR-genoma-LTR. El número de posibles sitios de integración es amplio y distribuido al azar. Una vez integrado el *provirus* adquiere las propiedades de un gen celular y es expresado con la ayuda de la RNA polimerasa II y replicado por enzimas celulares junto con el DNA cromosomal. El control de la transcripción del *provirus* depende directamente de las secuencias no codificantes del LTR viral. La transcripción del *provirus* genera genomas completos de RNA progenie. Durante la infección, son sintetizados factores activos en trans que afectan los niveles de transcritos y la cantidad relativa del producto de la mayoría de los genes del virión. Este mecanismo permite a los virus mantener el control de la expresión génica (**Coffin, 1994**).

El genoma viral es traducido y los productos, junto con el RNA recién sintetizado son ensamblados en el interior de la célula en partículas virales que son liberadas al unirse a la membrana celular. La liberación del virus es seguida de un rompimiento proteolítico de las poliproteínas del *virión* por una proteasa viral y proteasas celulares adicionales. Una infección lentiviral no es necesariamente citopática; los cultivos celulares infectados usualmente no muestran signos visibles de producción viral. Los lentivirus pueden ser producidos por las células en una variedad de tejidos sin efectos directos de deterioro orgánico (**Rubin et al., 1962**).

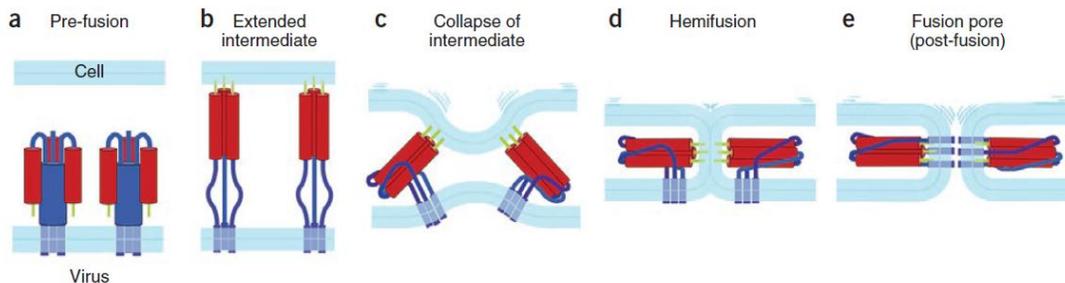


**Fig.2 Visión general del ciclo reproductivo de un lentivirus.** El virus progenitor se une a los receptores específicos de la superficie celular con la porción SU de la proteína Env llevando a la fusión y entrada del núcleo viral. Se lleva a cabo la reverso-transcripción que genera una copia de DNA de doble cadena a partir del genoma de RNA. Después es transportado al núcleo e integrado al DNA cromosomal. Es transcrito por la polimerasa II, esta transcripción genera copias de RNA con estructuras organizadas de la misma forma que las del virus original. Estas copias se convierten en la progenie conocida como virión y es ensamblada en la periferia de la membrana plasmática y es liberada para después alcanzar la forma madura Tomado de **Coffin, 1997**.

### 1.2.1 INTERACCIÓN LENTIVIRUS-CÉLULA HUÉSPED

La interacción inicial del virus con la célula huésped es un proceso complejo que varía de especie a especie entre los lentivirus. La vía general de un lentivirus a la célula ocurre al promoverse la fusión entre la membrana celular y la envoltura viral en un proceso que puede ser dependiente o independiente del pH. En el caso del HIV-1 la glicoproteína de envoltura viral (Env) se encuentra conformada por un complejo de dos proteínas denominadas gp41 y gp120, el complejo a su vez se encuentra formado de 3 estructuras de gp120 unidas covalentemente a tres estructuras de gp41. CD4 es el receptor primario para todas las cepas de HIV. La

interacción de gp120 con CD4 resulta en un cambio conformacional de Env. La proteína se abre formando un puente entre las dos bicapas. Todas las proteínas de fusión viral estudiadas hoy en día tienen elementos de integración bimembranales: un anclaje C-terminal transmembrana que mantiene a la proteína en la membrana viral y un parche hidrófobo (o bucle de fusión) que interacciona con la membrana de la célula blanco. El puente colapsa para que los elementos internados en la membrana (el péptido de fusión o bucle de fusión en la membrana blanco y el anclaje C-terminal transmembranal) se puedan unir. Este colapso perturba las dos membranas en una configuración en forma de campana aproximándolas y finalmente la estructura de hemi-fusión se abre para formar un poro, el cual después se expande (**S.C. Harrison, 2008**).



**Fig. 3. Secuencia de eventos en la fusión de las membranas promovidas por una proteína de fusión viral.** Los mecanismos pueden variar de acuerdo a la especie (a) la proteína en su conformación de pre-fusión, junto con su péptido de fusión o bucle retraído (b) intermediario extendido. La proteína se abre, extendiendo el péptido de fusión para interactuar con la bicapa (c) Colapso del intermediario extendido el segmento C-terminal de la proteína se dobla. Los segmentos de las tres subunidades se doblan independientemente para que en cualquier punto el proceso pueda extenderse a lo largo del eje del trímero (d) Hemi-fusión. Cuando el colapso del intermediario ha cedido lo suficiente para tener a las dos bicapas en contacto se forma el poro de fusión (e) los extremos de los dominios C-Terminales se unen previniendo que el poro se cierre. **Tomado de Harrison, 2008**

### 1.2.2 REVERSO TRANSCRIPCIÓN

La reverso-transcripción es la transición del genoma de RNA a una molécula de DNA de doble cadena, esta transición está dada por un mecanismo que comienza con la iniciación de la síntesis de DNA, continua con la síntesis de la cadena negativa y finaliza con la síntesis de la cadena positiva.

La reverso-transcripción del RNA viral se inicia en el citoplasma con la formación de un complejo conocido como RTC (complejo de reverso-transcripción), los requerimientos para desencadenar la iniciación de la síntesis de DNA son simples:

basta la exposición del complejo a los desoxirribonucleótidos presentes en el citoplasma (**Goff, 2007**). La síntesis comienza con la alineación de un RNA de transferencia conocido como tRNA<sup>Lys</sup> 3 mediante una ligasa a una región conocida como sitio de unión del cebador (PBS, Primer Binding Site) localizado en el extremo 5' del RNA genómico (**A**). Una vez ocurrida la unión, se forma un complejo de tRNA con la transcriptasa reversa a la vez que el tRNA actúa como cebador. (**B**) La síntesis de la cadena de DNA negativa (-) se inicia al copiar la parte del RNA ubicada en el extremo 5' región U5 no codificante y región R, ubicada en ambos extremos de la molécula de RNA, en forma de cDNA (**C**). Para continuar con la síntesis de DNA (-), el CRT (Complejo de reverso transcripción) es llevado, junto con el cDNA recién sintetizado hasta la región R del extremo 3' del genoma viral y la hebra de ADN recién sintetizado híbrida con la región R (**D**) complementaria en el ARN. La primera hebra de ADN complementario (ADNc) es extendida y la mayoría de ARN viral es degradado por una enzima conocida como RNasa-H para permitir que continúe la síntesis. Una vez que la cadena DNA (-) se completa, la síntesis de la segunda hebra se inicia desde el ARN viral restante. Para completar la cadena de DNA (+) es necesario copiar la recién formada cadena DNA (-). Ocurre la segunda transferencia de sitio (**E**): el PBS de la segunda cadena se mezcla con el PBS complementario de la primera hebra, para copiar la cadena, el complejo CRT genera una región de oligonucleótidos de polipurina conocida como PPT (polypurine tract) al borde de la región U3 del extremo 3', que funciona como cebador de la cadena ADN (+) la naturaleza química de los componentes de esta región impiden que sea hidrolizada por la RNasa-H (**F**) (**Miles et al., 2005**). Una vez que ha ocurrido la segunda transferencia, la RT continua la síntesis de la cadena DNA (+) hacia la señal de terminación central localizada río debajo de PPT. Ambas hebras pueden ahora incorporarse al genoma del huésped gracias a la enzima integrasa (**G**) (**Jonckheere, Anne & De Clerq, 2000**).

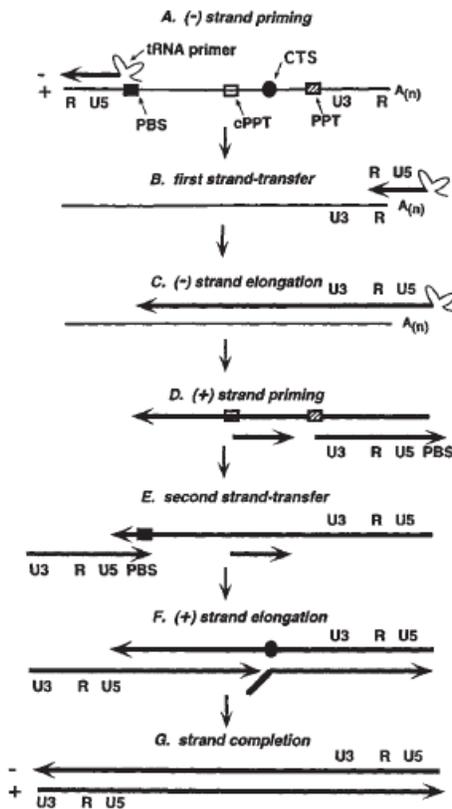


Fig. 4 Esquematización de los pasos de la reverso- transcripción. Jonckheere, Anne & De Clerq, 2000

### 1.2.3 INTEGRACIÓN: COMPLEJO DE PRE-INTEGRACIÓN Y TRANSLOCACIÓN NUCLEAR

Los lentivirus tienen la característica única de poder infectar a células que no están en división, este proceso ocurre gracias al transporte activo del DNA viral hacia el núcleo de una célula infectada. Este proceso depende en gran medida del complejo de pre-integración (PIC, pre-integration complex) para interactuar con la maquinaria de importación celular. La particular naturaleza del complejo de pre-integración es atribuida a las proteínas que lo componen, MA (matriz), IN (integrasa) y la proteína viral R (codificada por el gen *vpr*). Estas proteínas contribuyen al transporte a través del núcleo por mecanismos distintos: mientras MA e IN proveen señales de localización nuclear (NLSs) el receptor celular para las proteínas destinadas al núcleo, sin *vpr* las NLSs virales son débiles o no funcionales. Los intercambios moleculares entre el núcleo y el citoplasma son mediados por el complejo del poro nuclear. Los procesos de entrada del PIC al

núcleo aún permanecen poco claros, diferentes tipos de virus han mostrado diferentes mecanismos, en el caso del HIV que entra a la célula mediante el receptor CD4, el complejo de pre-integración debe pasar por la red cortical de actina mediante proteínas accesorias (Nef, ver adelante), sin embargo para algunos virus como el virus de la estomatitis vesicular (VSV) la estrategia es distinta, el virus gracias a una proteína conocida como G (VSV-G) entra a la célula a través de vesículas parcialmente recubiertas de clatrina<sup>2</sup>; las vesículas virales contienen más clatrina que cualquier otra vesícula de importación celular. El virus recluta componentes de la maquinaria de actina para su dirigir su transporte al núcleo (**Goff, 2008**).

### 1.3 GENOMA LENTIVIRAL.

Como ya se ha mencionado, durante el ciclo de vida de un lentivirus, específicamente antes de la integración, el RNA reverso-transcrito se encuentra en una etapa en la cual está por integrarse a la célula hospedadora, a este fragmento de DNA, se le conoce como *provirus*. El tamaño general de un *provirus* lentiviral, es de entre 9 a 10 kilobases. Similares a otros miembros de la familia *retroviridae*, ambos extremos del genoma del *provirus* están constituidos por regiones homologas repetidas de entre 600 y 900 nucleótidos, estas regiones también son conocidas como LTR son requeridas para la replicación, integración y expresión. Las LTR de un provirus se dividen esquemáticamente en tres regiones U3, R y U5 en la cual el primer nucleótido de la región de R corresponde al iniciador de la transcripción. El RNA genómico retiene la U5 y la R de los LTR en su extremo 5' y U3 y parte de la región R al extremo 3', resultando una estructura genoma viral en R-U5-genes-U3-R. La transcripción viral requiere de la interacción de factores celulares con secuencias localizadas en la región U3, aunque regiones adicionales encontradas en la región R y U5 son también necesarias. La región U3 comprende elementos promotores y reguladores, la región R incluye secuencias

---

<sup>2</sup> La función principal de la clatrina es recubrir las vesículas en el proceso de transporte entre membrana. Estas proteínas son reconocidas por receptores específicos. A partir de la invaginación de una porción de la membrana plasmática son transportadas hasta las destinaciones intracelulares. (Royle, Bright & Lagnado, 2004, *Clathrin is required for the function of the mitotic spindle*, *Nature* 434, 1152-1157).

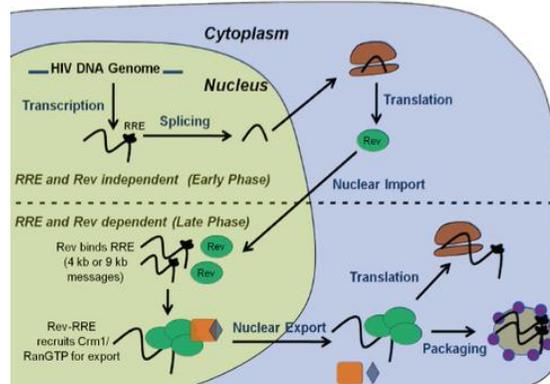
que forman productos estables en forma de bucle que están involucradas en la trans-activación mediada por Tat (ver adelante) (**Federico, 2003**).

Los lentivirus se distinguen de los retrovirus entre otras características por contar con marcos de lectura abiertos que codifican para un número distinto de genes regulatorios y componentes accesorios cuya función en el ciclo de vida se resume a continuación:

**La región  $\psi$ :** Una región, que abarca el final del extremo 3' de la LTR y el extremo 5' del gen *gag*, esta región designada como  $\psi$  (psi) o región de empaquetamiento es necesaria para la unión del genoma con la cápside (**D'Souza et al., 2001**).

**Tat y TAR:** Tat es una proteína reguladora que permite la transcripción de las copias del genoma lentiviral una vez que este se ha integrado. El elemento de respuesta de trans-activación del HIV-1 (TAR) es un elemento requerido para la activación del promotor viral y la replicación del virus. Se trata de una estructura en forma de bucle que actúa como sitio de unión de la proteína Tat, su interacción estimula la actividad de las LTR como promotores. La ausencia de *tat* inhibe la producción de progenie lentiviral (**Sommer et al., 2004**).

**Rev y RRE:** El producto del gen *rev*, la proteína Rev, permite que los fragmentos de mRNA del HIV que contengan un RRE (elemento de respuesta a Rev) sean exportados del núcleo al citoplasma. RRE solamente puede operar en presencia de Rev para que el RNA pueda ser utilizado en el empaquetamiento (**W. Pollard & H. Malim 1998**)



**Fig. 5 Esquema que ilustra de manera general el papel de RRE en el empaquetamiento de un lentivirus.** En la fase temprana los RNA son transcritos, uno de estos elementos es traducido para producir Rev el cual es después importado al núcleo, en la fase tardía (abajo) Rev se une a RRE en los transcritos de RNA y los exporta al citoplasma. **Imagen del dominio público bajo la licencia Creative Commons CC0 1.0 Universal Public Domain Dedication.**

### 1.3.1 DOMINIOS PRINCIPALES

Si bien el genoma lentiviral delimita estructuralmente la conformación del lentivirus y algunas especies de lentivirus pueden contar con un genoma complejo, se trata únicamente de componentes accesorios involucrados en la regulación, síntesis y procesamiento del RNA viral<sup>3</sup>, en general, todos los lentivirus cuentan con un genoma constituido por al menos tres dominios codificantes *env*, *gag* y *pol* (Fig.7 ) (Tang, 1999).

### 1.3.2 ENV

Env es un dominio contenido en el genoma que codifica para la envoltura lentiviral conocida como Env. El gen *env* no codifica para las proteínas de membrana gp120 y gp 41, sino para un precursor de ambos, gp 160. Durante la reproducción del HIV-1, las propias enzimas de las células hospederas rompen gp160 en gp120 y gp41. La expresión de Env está regulada por el producto de *rev* (Federico, 2003).

<sup>3</sup> En el HIV-1 existe una serie de componentes accesorios, las proteínas producto de los genes: *vif*, *vpr*, *vpu*, *tat*, *rev*, y *nef* están asociadas con el control de la expresión maduración liberación infectividad y patogénesis de los lentivirus. **M. Federico, 2003, From lentiviruses to lentivectors, Methods in Molecular Biology, vol. 229: Lentivirus Gene Engineering Protocols, Humana Press Inc., Totowa, NJ**

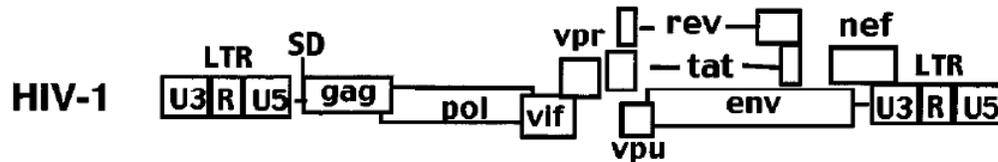
### 1.3.3 GAG

Las proteínas Gag del HIV-1, son necesarias para el ensamblaje de partículas virales. Las funciones de Gag durante el ciclo de vida son numerosas y complejas, ya que no solo están involucradas en el ensamblaje sino también en la maduración del virión. Las proteínas Gag son sintetizadas inicialmente como un precursor poli-proteico el cual es suficiente para producir partículas infecciosas en ausencia de otras proteínas virales o RNA empaquetable. En el caso del HIV-1 el precursor de Gag ha sido nombrado basado en su aparente peso molecular, Pr55Gag. Poco después que el virus se ha pegado a la célula huésped una proteasa característica del HIV, separa a Pr55Gag en las proteínas maduras, p17 Matriz (MA), p24 Cápside (CA), p7 nucleocápside (NC) y p6. Todo el proceso proteolítico que se lleva a cabo induce una transformación en la estructura del virión, MA permanece asociado a la parte interna de la membrana viral, mientras que CA se condensa para formar una cubierta alrededor del complejo formado por el RNA/NC. Una vez formadas las proteínas son dirigidas a la membrana de la célula huésped (**O. Freed, 1998**).

### 1.3.4 POL

Dentro del genoma de los lentivirus también se encuentra el gen *pol* el cual codifica para las enzimas virales; este gen no contiene codón de iniciación ya que inicia la transcripción en el marco de lectura -1 con respecto a *gag*. Como resultado la proteína Pol solo es sintetizada como parte de un complejo de proteínas Gag-Pol. Como ya se ha mencionado Gag se expresa como un precursor de 55 Kda (Pr55-Gag) y este es separado para convertirse en las proteínas estructurales NC y MA. *pol* es expresado en forma de una proteína fusionada de 160 Kda (Pr160-Gag-Pol) y es separado para producir MA, CA, p2, NC y las enzimas virales: proteasa (PR) la reverso-transcriptasa (RT) e integrasa (IN). Las enzimas virales catalizan una serie de pasos esenciales dentro del ciclo de vida del virus: PR cataliza el proceso proteolítico de los precursores de las proteínas Gag y Gag-pol. RT cataliza la conversión de cadena monocatenaria de RNA a una cadena de DNA de doble cadena para que sea integrada al genoma.

Finalmente IN el cual funciona como el mediador de la integración (**Follenzi et al., 2000**).



**Fig. 6. Estructura del genoma del HIV-1, el lentivirus prototipo.** Las regiones laterales corresponden a la repetición terminal larga (LTR) las principales proteínas estructurales Gag, Pol, Env. **Tomado de Tang, 1999**

## 1.4 LOS LENTIVIRUS COMO HERRAMIENTAS

A pesar de que ciertos aspectos de los mecanismos moleculares del ciclo de vida de los lentivirus permanecen aún sin descifrar, son sus capacidades altamente especializadas para la eficiente inserción del propio genoma dentro de una célula, el posterior secuestro de la maquinaria celular de la misma para replicarse y las diversas estrategias para infectar un amplio rango de células al mismo tiempo que evita su reconocimiento por el sistema inmune, que se consideró a los lentivirus como una posible herramienta para la introducción controlada de material genético en células. El uso de lentivirus como herramientas de transferencia génica requiere la eliminación de los genes que dotan al virus de capacidad infecciosa y patógena, dejando únicamente aquellos que participan en la inserción del material genético agregando, además el material genético de interés (**Saenz & Poeschla, 2004**)

La necesidad de herramientas de transferencia eficientes surge de las dificultades que entraña la introducción directa de material genético desnudo en el interior de una célula, el cual rápidamente es degradado por nucleasas (**D. Kornberg & Y. Lorch, 1999**).

### 1.4.1 ESTRATEGIAS Y MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GÉNICA

Para lograr introducir y expresar genes exógenos en células en cultivo o en tejidos, se han desarrollado una variedad distinta de vehículos de transferencia o vectores. Los vectores lentivirales se originaron a partir de técnicas conocidas como tecnologías recombinantes las cuales comprenden una serie de métodos

aplicados a la biotecnología que permiten la creación, manipulación y posterior introducción de fragmentos de DNA/RNA a distintos organismos para que adquieran, a través de la incorporación de nuevos genes, cualidades que en circunstancias normales no tendrían. Los métodos que definen al conjunto de tecnologías recombinantes son: El uso de enzimas de restricción, la síntesis química de secuencias de nucleótidos y la replicación de virus y plásmidos (**B. Alberts et al., 2002**).

## **PLÁSMIDOS Y VECTORES VIRALES**

Los vectores virales, así como los plásmidos, originalmente fueron desarrollados como una alternativa especializada para la introducción de DNA desnudo para experimentos de biología molecular.

Un plásmido es una molécula de ADN que tiene la capacidad de replicarse y transcribirse independientemente. Estos son usados para transferir genes desde un organismo a otro y como un procedimiento estándar es agregado un marcador el cual le provee al organismo la capacidad de expresar un fenotipo que puede ser seleccionado a favor o en contra.

Los plásmidos están presentes de manera natural en las bacterias, son utilizados como mecanismo de transferencia y confieren ventajas al portador en condiciones de crecimiento determinadas, las bacterias pueden entonces, asimilar el plásmido en su interior en un proceso denominado transformación, el cual puede ser inducido mediante procesos químicos dentro de bacterias competentes<sup>4</sup> (**Smillie & Garcillán-Barcia, 2010**)

La importancia de la introducción de plásmidos en bacterias radica en la relativa facilidad de estas últimas para ser cultivadas a gran escala permitiendo obtener grandes cantidades de proteínas producto de genes o bien generar múltiples copias de un fragmento particular de ADN.

---

<sup>4</sup> La competencia de una bacteria está dada por su capacidad de introducir plásmidos, existen pocas bacterias con una competencia natural, es por eso que esta es inducida, volviendo permeables a las bacterias de forma pasiva esto se conoce como competencia artificial (J. M. Solomon, D. Grossman, *Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria*, 1996 Volume 12, Issue 4, April 1996, Pages 150–155).

Los plásmidos tienen un papel determinante en la generación de vectores virales, ya que para utilizar la eficiente maquinaria de inserción de un lentivirus es necesaria una célula eucarionte, únicamente un eucarionte es capaz de producir una partícula viral. Comparado con métodos químicos tales como fosfato de calcio, lipofectamina o electroporación, la infección viral puede asegurar que cerca del 100% de las células sean infectadas sin afectar de manera significativa la viabilidad de las mismas.

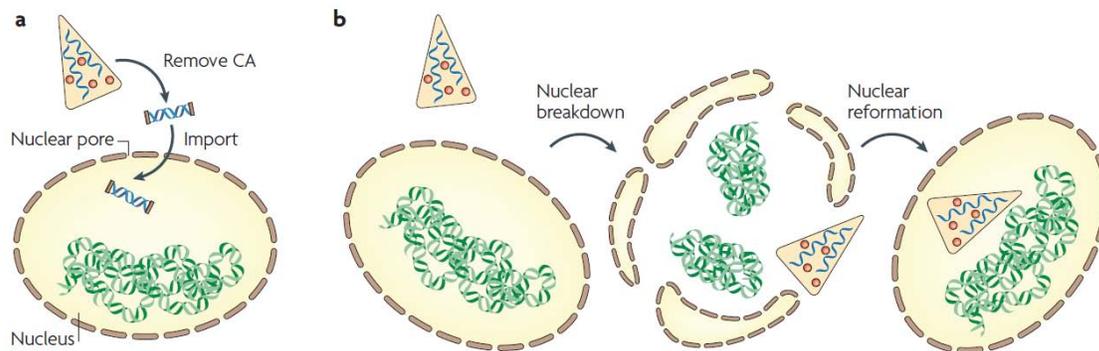
Para generar una partícula viral se ideó un mecanismo en donde se extrae DNA plasmídico previamente producido mediante el cultivo de bacterias a las que fueron introducidas secuencias codificantes para las proteínas que conforman estructuralmente un virus, para después ser introducidas en células animales generando partículas virales y liberándolas al medio de cultivo, mismo que después es recolectado y utilizado para infectar con eficiencia las células blanco (**Sastry et al., 2002**).

## **1.5 FABRICANDO UN VECTOR LENTIVIRAL**

La estructura básica del vector está compuesta de una secuencia de DNA que consiste en un inserto (transgen o transfer) y una secuencia larga que sirve como soporte estructural del transgen. El propósito del vector que transfiere información genética a otra célula es típicamente para aislar, multiplicar y expresar un gen de interés. Este tipo de vectores se les conoce como: vectores de expresión, ya generalmente contienen una secuencia promotora que dirige la expresión del gen insertado.

Los vectores lentivirales se construyen a partir de componentes presentes en los virus patógenos aislados en la naturaleza, estos componentes pueden derivar de primates o de otro tipo de lentivirus de animales. A pesar de que durante los pasados veinte años se utilizaron diferentes técnicas de transferencia de genes basadas en diferentes virus no humanos; el virus de la Leucemia murina (MLV), uno de los primeros virus utilizados para crear vectores lentivirales, demostró no ser tan eficiente, tanto para ensayos *in vitro* como ensayos *in vivo*. Finalmente en la pasada década se han desarrollado nuevos vectores, más eficientes, basados en lentivirus como el de inmunodeficiencia humana HIV, ya que a diferencia de

otros vectores son capaces de infectar células que no están en división incluyendo neuronas; hepatocitos; miocitos cardiacos, células humanas CD34+ y CD38+ y células humanas hematopoyéticas. La señal de localización nuclear presente en la proteína de matriz (MA, codificada por *gag*) del virus HIV-1 permite la entrada del complejo de pre-integración al núcleo a través de la membrana nuclear, la cual permanece intacta, mientras que los vectores derivados de MLV requieren la ruptura de la membrana durante la mitosis para poder tener acceso al genoma (**Fig. 7**). Adicionalmente la ineficiencia de los vectores derivados del MLV se relaciona a la escasez de receptores para MLV en cierto tipo de células; por ejemplo las HSC (hematopoyetic Stem Cells). Es por esta razón que se buscó diseñar vectores híbridos, utilizando secuencias de otros virus que fueran mucho más eficientes, por ejemplo el uso de la glicoproteína de envoltura (Env) del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G) permite que el vector se dirija hacia los fosfolípidos de la membrana en vez de receptores específicos, adicional a esta característica los vectores producidos con la glicoproteína de VSV-G producen un tipo más estable que puede resistir la ultra-centrifugación lo cual puede permitir la concentración del vector si se desea obtener títulos altos en un menor volumen (**Naldini *et al.*, 2006**).



**Fig.7 Rutas alternativas para la entrada nuclear del DNA retroviral a)** El complejo PIC puede ser importado al núcleo por células que no están en división **b)** la infección por MLV requiere que la célula esté en división, y el PIC solamente puede tener acceso al núcleo después que la membrana nuclear es separada por acción de la mitosis.

Los vectores derivados del virus de inmunodeficiencia humana del tipo 1 (HIV-1) han sido desarrollados de manera que los genes asociados a la virulencia *env*, *vif*, *vpr*, *vpu* y *nef* han sido eliminados.

Un sistema de expresión de tres plásmidos es utilizado para que el primer plásmido contenga el constructo del promotor del citomegalovirus humano dirija la expresión de todas las proteínas requeridas Gag, Pol, Tat y Rev mientras que el segundo constructo codifica para la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV-G). (Naldini et al., 1996). El tercer plásmido contiene finalmente el gen de transferencia (transfer o gen de interés). Adicionalmente es eliminada parte de la secuencia U3 en la región LTR (Zufferey et al., 1998) con este sistema, también llamado SIN (Self-inactivating) el promotor de la transcripción se pierde durante la integración al cromosoma de la célula, permitiendo la regulación de la expresión del gen transducido por vías no virales (Zhong fu et al., 1986).

De acuerdo a la configuración arriba descrita, el segundo vector puede proveer un ácido nucleico que codifique para un gen de envoltura viral (*env*). El gen *env* puede derivar de cualquier virus. El producto del gen *env* debe poder infectar en un rango mayor de tipos celulares.

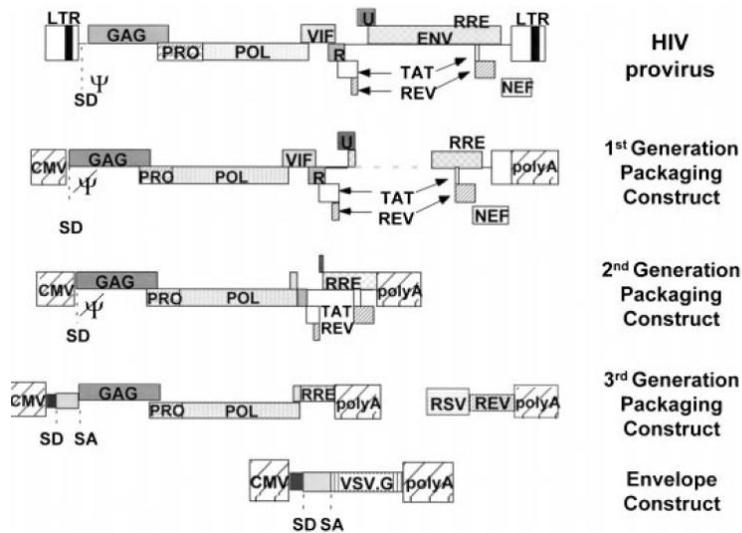
El vector que provee la secuencia de ácido nucleico de *env* es asociado operativamente con secuencias reguladoras, por ejemplo un promotor. La secuencia reguladora puede ser cualquier promotor eucariota, por ejemplo el promotor del citomegalovirus humano (CMV), éste se debe situar adyacente a las regiones LTR. Preferiblemente la secuencia reguladora es endógena del virus a partir del cual el vector es construido.

De esta manera, un primer plasmido puede proveer del ácido nucleico codificante para las proteínas Gag y Pol. Otro plasmido puede llevar el ácido nucleico correspondiente para *env*, finalmente el tercer plásmido conteniendo el vector de transferencia, es introducido a la célula empaquetadora que producirá partículas con capacidad de infectar, llevando el gen de interés (Naldini et al., 2006).

## **SISTEMAS: SISTEMA DE EMPAQUE DE SEGUNDA GENERACIÓN**

Existen diferentes sistemas estandarizados para la generación de vectores lentivirales, seguros, estables y de alta capacidad de infección. Estos sistemas nacen de la necesidad de disminuir los riesgos que conlleva la constante generación de virus híbridos. De esta manera nacen los llamados vectores de

segunda generación, cuya principal característica radica en una eliminación de 400 pb en la región U3 de la LTR del extremo 3', permitiendo que la transcripción se lleve a cabo por elementos no virales. Sin embargo estos vectores aún contienen LTR 5' naturales. En general los vectores lentivirales con una LTR 5' de tipo natural (wildtype) necesitan un sistema de empaquetamiento de segunda generación ya que éstos requieren Tat para su activación pues Tat se encuentra asociado directamente con REV, necesario para la importación hacia el citoplasma del genoma viral recién transcrito. Hoy en día, existen opciones variadas de sistemas de empaquetamiento para la elaboración de vectores lentivirales, siendo los más accesibles los de segunda generación: psPAX2 o CMV-dR8.2 dvpr más comúnmente utilizados para empaquetamiento y para envoltura pMD2.G o pCMV-VSVG (E. Vigna & L. Naldini, 2000)



**Fig. 8. Representación esquemática de constructos de empaquetamiento típicos derivados del HIV-1.** Arriba una representación esquemática del provirus del HIV-1. Primera, segunda y tercera generación de constructos que contienen secuencias derivadas del HIV-1. El constructo para envoltura contiene, secuencias no relacionadas con el HIV-1. En los vectores de empaquetamiento el promotor CMV y la señal de poliadenilación (polyA) fueron agregadas en el lugar de las LTR en la región 5' y 3', respectivamente. En la primera generación, todos los genes codificantes para proteínas estructurales y accesorias del HIV-1 excepto por el de envoltura son mantenidos. En la segunda generación, todos los genes accesorios han sido eliminados. En la tercera generación las secuencias que codifican para tat y rev han sido eliminadas. **Tomado de E. Vigna & L. Naldini, 2002**

## PLÁSMIDO pMD2.G

El plásmido pMD2.G contiene el sistema de envoltura de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular y su promotor, así como tag VSV-G, los tags son pequeñas secuencias de péptidos escogidas por su alta afinidad con ciertos anticuerpos.

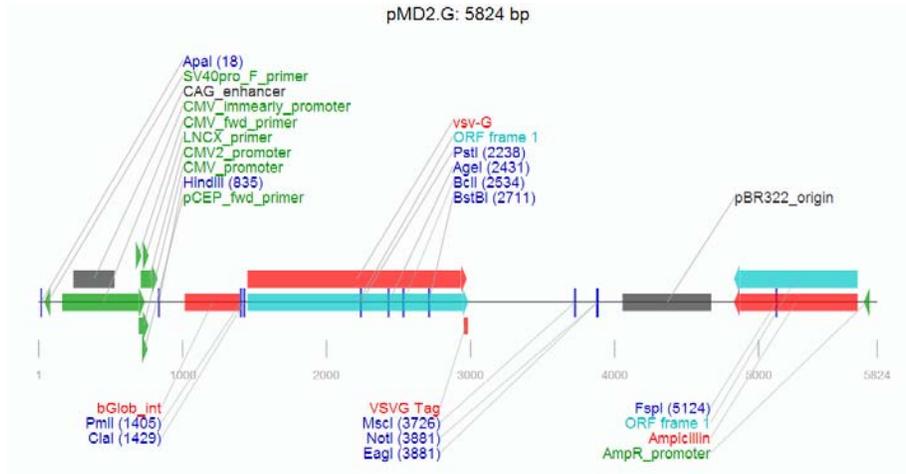


Fig.8. Mapa lineal del plásmido pMD2.G que muestra el tamaño del constructo así como, sitios de corte, marcos abiertos de lectura, el promotor de VSV-G y el tag de VSVG

## PLÁSMIDO psPAX2

psPAX2 es el plásmido que tiene el mayor peso molecular de este sistema, pues contiene los genes necesarios para generar la cápside y la matriz lentiviral, los genes codificatnes para las proteínas Rev y Tat, así también contiene la región rica en poliIplurina, Gag, Pro y Pol, derivados del HIV-1.

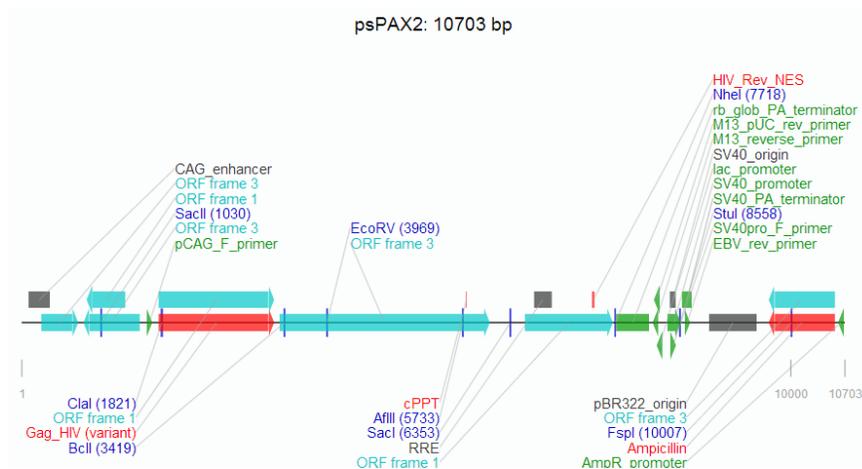


Fig. 9. Mapa de la secuencia del plásmidos psPAX2, que contiene marcos abiertos de lectura, sitios de corte y los genes pro, gag, rev y tat derivados del HIV-1



## EMPAQUETAMIENTO DEL VECTOR

Una vez que se cuenta con un sistema de empaquetamiento viable y seguro, es posible comenzar a generar partículas lentivirales. Para este propósito existen procesos clave que influyen directamente en la estabilidad y capacidad de introducción de genes del mismo. Como ya se ha revisado, solamente una célula de mamífero puede producir un lentivirus, pues es necesaria una maquinaria celular completa de expresión, regulación y síntesis de las proteínas que conforman al vector. Para esta tarea resulta de gran utilidad el uso de lo que se conoce como: línea celular de empaquetamiento, usualmente la línea celular más utilizada es HEK 293 (Human Embryonic Kidney Cells) o la variante conocida únicamente como 293-T transformada por la expresión del antígeno T del SV40 cuya pRb<sup>5</sup> se encuentra inactiva, que permite la replicación episomal de plásmidos transfectados conteniendo el origen de replicación del SV40. Esto permite la expresión temporal extensa de los productos génicos deseados; cualquier línea celular similar puede ser utilizada para este tipo de funciones por ejemplo HeLa y COS (**G. Shaw et al., 2002**).

## TRANSFECCIÓN

La transfección es un proceso clave en la generación de vectores lentivirales, pues se trata del proceso en el que los plásmidos serán introducidos a la célula de empaquetamiento. La transfección consiste en la inserción de material genético por medio de una herramienta de transferencia, usualmente de naturaleza química. Existen hoy día una serie de técnicas de transfección que han dado resultados favorables para la producción de vectores lentivirales, siendo las dos más comunes, el uso de lípidos catiónicos y la precipitación con fosfato de calcio Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> (**G. Tscornia, O. Singer & M. Verma 2006**).

La transfección con fosfato de calcio requiere la mezcla de dos soluciones: la primera que contiene iones fosfato, la cual se combina con una solución de cloruro

---

<sup>5</sup> Proteína del retinoblastoma: Una de las funciones principales de pRb es la inhibición de la progresión del ciclo celular antes de la entrada en mitosis, de manera que la célula no entra en división hasta que se dan las condiciones adecuadas: pRb impide por tanto la proliferación celular. Por ello, la inactivación de pRb puede suponer la aparición de un cáncer, ya que con ello se elimina un importante freno a la proliferación celular. (**Münger, Howley, 2002, Human papillomavirus immortalization and transformation functions. Virus Res. 89 (2): pp. 213–28**).

de calcio. Los mecanismos de la precipitación por fosfato de calcio aún no son bien comprendidos, sin embargo se sabe que cuando ambas soluciones se combinan, se forma un precipitado fino formado por el calcio cargado positivamente y el fosfato cargado negativamente que se adhiere a la superficie celular para posteriormente ser llevado al interior junto con el DNA (**R.E. Kingston, C.A. Chen, JK Rose, 2003**).

El método de lípidos catiónicos, se basa en la interacción lípido-catión para la formación de liposomas, vesículas artificiales con una composición muy similar a la de la membrana plasmática de la célula. Los complejos se forman al asociarse los lípidos con el ácido nucleico, fusionándose este complejo con la membrana, un solo plásmido puede estar rodeado de suficientes lípidos catiónicos como para neutralizar completamente la carga negativa del DNA y proveen un complejo de carga positiva que se asocia con la superficie de la célula cargada negativamente (**P.L. Felgner et al., 1987**)

#### **1.6 TITULACIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES: IMPORTANCIA DE LA TITULACIÓN Y TÉCNICAS DE TITULACIÓN EXISTENTES**

Los vectores lentivirales, desde su desarrollo en la década de los setenta (**Goff & Berg, 1976**) hasta nuestros días han cobrado importancia como una de las herramientas más estables y eficientes en la introducción de genes en una variedad de células. Las aplicaciones comunes de los vectores lentivirales incluyen la restauración de funcionalidad en genes a través de terapia génica, investigación en biología celular estándar ya sea *in vivo* o *in vitro*. Para cualquier aplicación de un vector lentiviral además de las arriba mencionadas, resulta de vital importancia titular el vector con el que se trabaja siempre en simultáneo a los ensayos que se estén realizando, ya que la titulación es útil no solo para determinar la calidad de la producción viral sino para establecer patrones de infección, también para calcular el MOI (Multiplicity of infection) este último esencial para el establecimiento de líneas celulares estables y para aplicaciones relacionadas con el uso de vectores para terapia génica (**A.Nayr et al. 2008**)

Las opciones principales para titular vectores lentivirales incluyen la evaluación de la actividad de la reverso transcriptasa o cuantificar el RNA viral contenido en el

sobrenadante por northern blot. Una técnica específica para la titulación de vectores lentivirales lo constituye el ensayo enzimático de ELISA, sin embargo en ocasiones la proteína p24 cuantificada en este ensayo, se encuentra en forma libre lo cual no asegura la medición exacta del título. Es posible también evaluar la fluorescencia del reportero de expresión mediante FACS, sin embargo, este último no permite discriminar entre las células con integraciones múltiples. Estas técnicas además de costosas implican un consumo de tiempo considerable, una de las formas más prácticas es la titulación por PCR-tiempo real (one step), ya sea mediante la evaluación de DNA genómico extraído de las células o bien evaluando el RNA del sobrenadante del mismo modo, de esta manera se reducen los tiempos y costos. La cuantificación por tiempo real se conforma como una PCR estándar, sin embargo a la mezcla de reacción es agregada un fluoróforo (SYBR-green) para medir fluorescencia tras excitarlo a la longitud de onda apropiada, es posible medir la tasa de generación del producto específico. Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación. Una vez obtenida la gráfica de amplificación los valores en X (número de ciclos) son denominados CT (o Ct, del inglés cycle threshold, cuya traducción es ciclo umbral), aunque también pueden llamarse CP (del inglés crossing point, o punto de cruce). El CT se define entonces como el número de ciclos requeridos para que la señal de fluorescencia cruce el umbral. Los niveles de Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de ácido nucleico en una muestra, lo que significa que a mayor cantidad de ácido nucleico, mayor será la cantidad de fluoróforo excitado y menor el ciclo de amplificación necesario para el cruce del umbral. El Ct puede ser utilizado para cuantificar la concentración del producto de interés, pues existe una correspondencia entre este y la cantidad de ácido nucleico presente en una muestra.

**(L. Cupelli *et al.*, 2000)**

## **TITULACIÓN EN LA REPROGRAMACIÓN**

En recientes fechas, los vectores lentivirales resultaron determinantes como parte de la metodología que llevó al desarrollo de las células madre pluripotentes inducidas (IPSC) cuyo descubrimiento le valió a Shinya Yamanaka el premio nobel de medicina 2012 ([www.nobelprize.org](http://www.nobelprize.org)).

La reprogramación de células somáticas a iPSC es lograda cuando los factores Oct4, Sox2, KLF 4 y C-myc son insertados en el genoma de la célula a reprogramar en forma de un gen policistrónico denominado OKSIM (**Takahashi et al, 2007**).

En el laboratorio de Medicina Genómica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, rutinariamente se fabrican vectores lentivirales conteniendo el gen policistrónico necesario para la reprogramación de células humanas, más comúnmente a partir de células de pulpa dental de pacientes, previamente expandidas en cultivo (DPSC, Dental Pulp Stem Cells) utilizando el plásmido OKSIM, sin embargo, a pesar de que OKSIM cuenta con un reportero integrado, este plásmido no puede ser utilizado para titular. Adicionalmente, cuando se dice que una célula ha sido reprogramada, no se trata de una propiedad cualitativa pues esta no involucra solo cambios de fenotipo a nivel morfológico, sino modificaciones epigenéticas complejas, que hacen difícil la caracterización de las mismas, ya que la reprogramación es más bien una propiedad cuantitativa, las iPSC son similares entre sí por el tipo de modificaciones que presentan una vez transducidas, pero no en el nivel de estas modificaciones, de este hecho proviene la necesidad de establecer protocolos que generen producciones estables con títulos virales altos (**R. Pelayo, I. Velázquez & J.S. Olalla, 2011**).

Para el propósito del presente trabajo, un título funcional se refiere a la concentración de partículas del vector que son capaces de transducir a la célula blanco. Como se ha mencionado, actualmente existe una variedad de metodologías para la medición del título de un vector lentiviral, sin embargo en nuestro país no han sido realizados estudios a fondo sobre este tema.

## **HIPÓTESIS**

---

Existe una correspondencia entre la señal de fluorescencia de GFP y los valores de Ct de la amplificación por PCR-Tiempo Real de RNA y DNA en los diferentes volúmenes de concentrado/sobrenadante, los valores de esta correspondencia son inversamente proporcionales y permiten cuantificar, mediante la generación de curvas de titulación, la integración de partículas virales dentro del genoma de las células de interés.

## **OBJETIVOS**

---

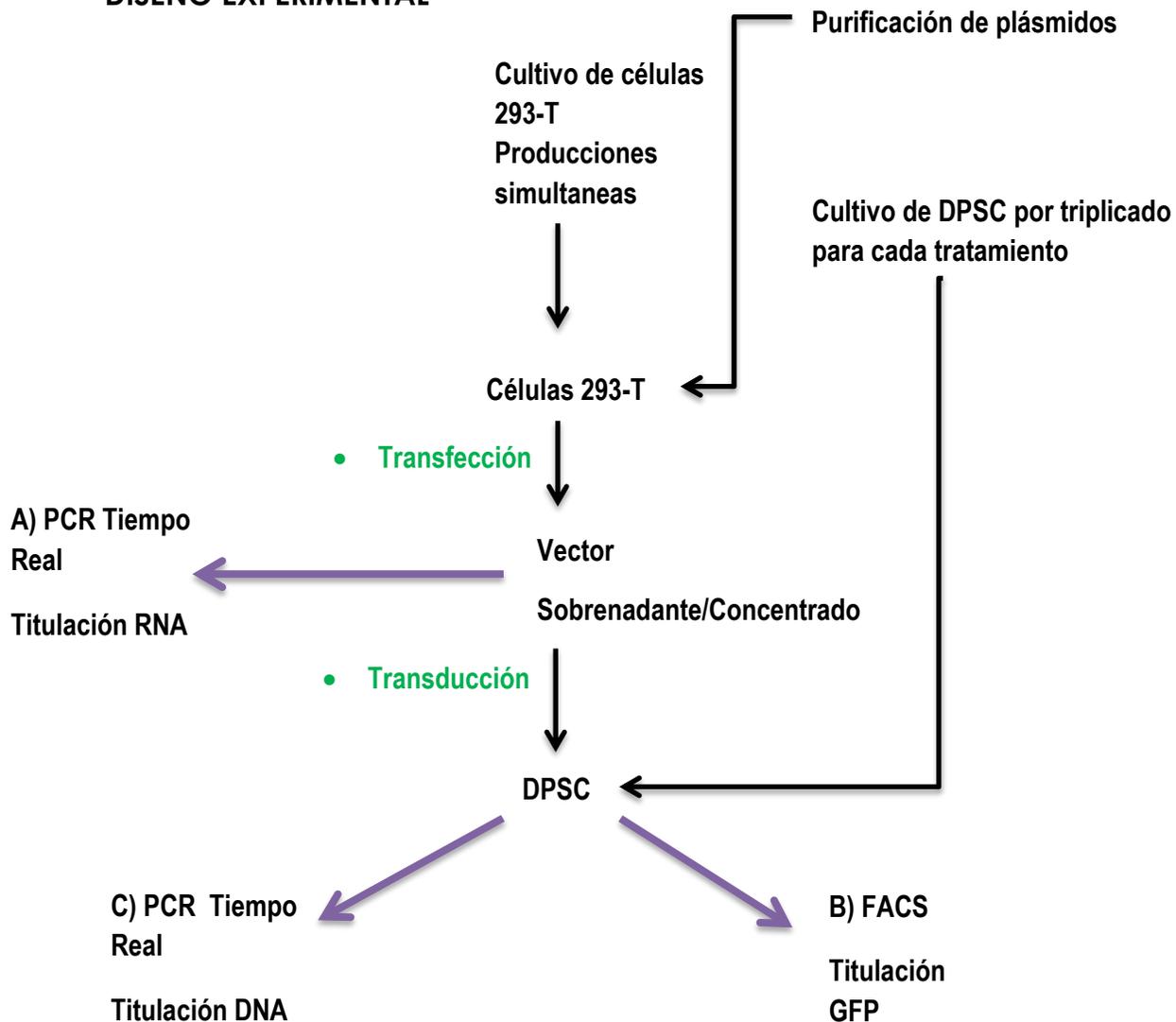
- Generar un protocolo de transfección para producir vectores lentivirales estables y con un alto título.
- Titular el vector lentiviral de GFP, utilizado como reportero de infección para la reprogramación de células humanas.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Estandarizar la titulación del vector reportero de GFP mediante la cuantificación por PCR-Tiempo Real de RNA y DNA de diferentes volúmenes de sobrenadante/concentrado del vector.
- Comparar la cuantificación por PCR-Tiempo Real, con el porcentaje de fluorescencia obtenido a partir de FACS de diferentes volúmenes de sobrenadante/concentrado del vector para generar una curva de titulación.

## 2. METODOLOGÍA

### DISEÑO EXPERIMENTAL



**Fig. 11. Esquema del diseño experimental.** Una vez purificado el plásmido, se cultivan y expanden células 293-T para el empaquetamiento del vector lentiviral. Por separado se cultivan DPSC previamente aisladas hasta el momento en que serán transducidas con el vector evitando utilizar el triple de células al menos por cada tratamiento. Se realiza la transfección de acuerdo a la disponibilidad de las metodologías distintas, esta transfección se realiza en simultáneo para al menos 3 producciones del mismo vector lentiviral que contiene e-GFP. Se realizan las cosechas del sobrenadante y de acuerdo a la evaluación de la fluorescencia relativa es concentrado. **(A)** RNA es extraído de las producciones realizadas en simultáneo, utilizando los mismos volúmenes que se utilizarán para transducir las DPSC. Se realiza una PCR en tiempo real para evaluar el número de posibles integraciones. El concentrado/sobrenadante de otra de las producciones **(B)** es puesto en contacto con el vector por 12 horas, una vez comprobada la expresión del transgen se procede a realizar el análisis FACS. El concentrado/sobrenadante **(C)** de la producción restante es puesto en contacto con DPSC por 12 horas, una vez comprobada la expresión del transgen se realiza la extracción de DNA con el propósito de realizar un PCR en tiempo real para evaluar el número de integraciones (copias) del vector.

## **EL PRESENTE PROYECTO SE DIVIDIÓ EN TRES FASES METODOLÓGICAS:**

1. Estandarización y definición de un protocolo para la producción de vectores lentivirales estables, con un título alto.
2. Estandarización de ensayos de titulación con citometría, DNA y RNA.
3. Titulación del vector lentiviral utilizado como reportero en los distintos ensayos de reprogramación de células humanas.

### **1. ESTANDARIZACIÓN Y DEFINICIÓN DE UN PROTOCOLO PARA LA PRODUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES ESTABLES CON UN TÍTULO ALTO.**

#### **PURIFICACIÓN DE PLÁSMIDOS UTILIZADOS PARA TRANSFECCIÓN.**

Addgene es una organización no lucrativa que almacena y distribuye plásmidos, los tres constructos utilizados fueron adquiridos mediante su portal de internet [www.addgene.org](http://www.addgene.org), estos son distribuidos para posteriormente ser introducidos en bacterias competentes las cuales son cultivadas y posteriormente el DNA genómico es extraído y purificado. Para la construcción del vector se utilizaron los plásmidos psPAX2 y pMD2.G los cuales contienen las secuencias de los genes de empaque y envoltura respectivamente, estos plásmidos una vez adquiridos habían sido introducidos en *E.coli* previamente mediante transformación, por tanto la producción de plásmido dependió únicamente del cultivo de dichas bacterias y posterior extracción y purificación del DNA bacteriano.

<b>PLÁSMIDO (Addgene)</b>	<b>Tamaño inserto (bp)</b>	<b>Inserto(s)</b>
<b>psPAX2</b>	10703	Genes de empaque
<b>pMD2.G</b>	5824	Genes de envoltura
<b>pLenti CMV GFP</b>	7889	e-GfP; Puro

Cuadro 1. Tamaño del inserto y función de los plásmidos utilizados para la generación del vector lentiviral.

En un matraz se prepararon 200 ml de medio LB estéril por cada plásmido utilizado (Ver Cuadro 1) a cada matraz le fueron adicionados 20 µl de cultivo bacteriano previamente descongelado de *Escherichia coli* transformada junto con 2 µl de antibiótico (ampicilina 100mg/ml). Posteriormente se cultivaron las bacterias en agitación entre 16-18 horas a 300 rpm, el contenido fue centrifugado durante 20 min a 8 000 rpm. El sobrenadante fue desechado y Posteriormente se siguió el protocolo correspondiente a QUIAGEN, plasmid purification maxi kit ® (ver anexo). Una vez purificado el plásmido fue almacenado a -20 °C hasta su uso.

### **CULTIVO DE LA LÍNEA CELULAR DE EMPAQUETAMIENTO 293-T**

Para el empaquetamiento fueron utilizadas células 293T/17 (HEK 293T/17) previamente adquiridas en el centro de distribución de líneas celulares ATCC número de catálogo CRL-11268™ cultivadas hasta el pase 20, se preparó un plato de células 293 T por cada plásmido a transfectar. En un baño María a 35°C se descongeló 1 vial, el cual equivale aproximadamente a 1, 000,000 de células, durante dos minutos. Las células 293 fueron cultivadas en un plato de 100mm. Por separado se prepararon 10ml de DMEM adicionado con SFB al 10% por plato de cultivo.

Las células descongeladas son agregadas (1ml.) a un tubo Falcon con 10 ml. De medio 199 sin suero y centrifugadas a 1200 rpm por 5 minutos.

El medio de centrifugación es desechado y el pellet re-suspendido en 1ml. de DMEM+FBS vertido sobre un plato de cultivo, al que se la agregan, adicionalmente 9 ml de DMEM+FBS previamente temperados a 35 °C. Las células son mantenidas cambiando el medio cada 48 horas hasta alcanzar la confluencia deseada.

## **TRANSFECCIÓN: TÉCNICAS Y PROTOCOLOS**

Durante la realización del presente, se utilizaron dos técnicas distintas de transfección, de acuerdo a la disponibilidad eventual de cada una:

- a) Fosfato de calcio  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  Mammalian Cell Transfection Kit, Millipore Merck®
- b) Lípidos Catiónicos Transfast, Promega ®

A continuación se describirán ambas técnicas para, posteriormente, presentar los protocolos considerados para la delimitación de uno que produjera los resultados esperados.

### **α) PRODUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES UTILIZANDO FOSFATO DE CALCIO**

Se Cultivaron 293T hasta un 80% de confluencia en medio RPMI o DMEM-F12 (+piruvato) suplementado con 10% de FBS.

El medio de cultivo fue reemplazado cada 24 horas y nuevamente reemplazado 4 horas antes de realizar la transfección.

Para la transfección se colocaron 10 mL de medio **SIN ANTIBIÓTICO + 10% de suero** por cada plato. 1 hora antes de la transfección preparar el HBS 1X. Por cada plato se mezclaron los siguientes reactivos:

- 440 ul de **Agua ultrapura**
- 50 ul de **HBS 10X** (119.15 g/L HEPES+163.63 g/L NaCl)
- 15 ul de **NaOH** (40.0 g/L)

Fueron Numerados 2 tubos de 15 mL como #1 y #2 y se temperaron.

En el #1 se colocaron 500 ul del HBS 1X y 10 ul de **solución de fosfato** (19.318 g/L para fosfato de sodio monobásico y 37.52 g/L fosfato de sodio bibásico).

En el tubo #2 fueron colocados 430  $\mu$ l de agua ultra pura menos el volumen correspondiente de plásmido, los cálculos de la cantidad de plásmido a utilizar se realizan en base a la cantidad de mg/mL calculados previamente, asegurándose de tener una concentración final de 35 ng/mL finales de DNA (psPAX2: 12 ug; pMD2.G: 5 ug; vector: 18 ug). Se Mezcló suavemente con vórtex y se adicionaron 60  $\mu$ l de solución de **cloruro de calcio** (294.04 g/L) y se mezcló nuevamente de manera suave.

Con una pipeta de 1 mL se burbujeo dentro del tubo #1 mientras se añadía lentamente todo el contenido del tubo #2 con una micropipeta. Se mantuvo a la mezcla por 20 minutos a temperatura ambiente. Los precipitados formados de la mezcla fueron re-suspendidos por pipeteo hasta observar una solución homogénea (Se pipeteo suavemente para no dañar el DNA plasmídico).

Se colocó la mezcla en el plato con las células agitando lentamente para homogenizar el medio con la solución de transfección. Se Incubó durante 12-14 horas a 37°C.

Se retiró completamente el medio de transfección y se colocaron 12 mL de medio de cultivo fresco.

Se incubó por 24 horas y se recuperó el sobrenadante (cosecha #1). Se agregaron nuevamente 12 mL de medio de cultivo fresco. En este momento fue posible verificar la señal del reportero de GFP.

Incubar por 12 horas y recuperar el sobrenadante (cosecha #2). Colocar 12 mL de medio de cultivo fresco.

Finalmente se Incubó por 12 horas y se recuperó el sobrenadante (cosecha #3). Si las células se encuentran viables aún, se pueden realizar hasta una 5ta cosecha.

## **b) PROTOCOLO 0: PRODUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES UTILIZANDO LÍPIDOS CATIÓNICOS (TRANSFAST-PROMEGA)**

Se cultivaron 293T hasta un 80% de confluencia en medio RPMI o DMEM-F12 (+piruvato) suplementado con 10% de FBS.

El medio fue retirado y las células despegadas con 2 mL por plato de tripsina al 0.025% en solución EDTA 0.53mM. Incubar por 5 minutos máximo a 37°C. Se

Inactivó la tripsina adicionando 4 mL de medio con 20% de FBS y mezcló cuidadosamente por pipeteo con una pipeta de 10 mL para remover todas las células del plato de cultivo. Fue colocada la mezcla celular en un tubo de 15 mL y centrifugada a 250xg durante 5 minutos.

Se prepararon 50 mL de medio temperado RPMI o DMEM-F12 + 10% de FBS por cada plato de 293T fueron colocados 8 mL de medio en platos de 100 mm. Se utiliza un plato por vector a producir.

Fue re-suspendido el pellet celular suavemente con 1 ml. de medio con FBS, y se colocan 142  $\mu$ L en cada plato. Se mezcló por rotación del plato de cultivo. Se incubó a 37°C por un periodo mínimo de 24 horas antes de iniciar la transfección, hasta que las células alcanzaron una confluencia de aproximadamente 80% (24-36 horas). El reactivo Transfast fue diluido en 400  $\mu$ L de agua libre de nucleasas y congelado a -20°C 3 horas antes de la transfección. Se reemplazó el medio de cultivo por medio fresco (DMEM-F12 + FBS al 10%) de 2 a 4 horas antes de la transfección (este paso permite que las células sigan dividiéndose mientras se realiza la transfección).

Se preparó la mezcla de transfección para cada plato en tubos de 50 mL. Para cada plato la mezcla se compone de: 6 mL de medio DMEM alto en glucosa, plásmidos de envoltura, empaque y vector genómico en una proporción de 1:3:4 a un total de 35  $\mu$ g (envoltura 5 $\mu$ g, empaque 12 $\mu$ g y vector 18 $\mu$ g) y 90  $\mu$ L de reactivo TransFast a 1 $\mu$ g/ $\mu$ L de stock (dar un vórtex durante 10 segundos al frasco de TransFast antes de usarlo). Inmediatamente luego de colocar TransFast se agitó con vórtex a la mezcla de transfección y se incubó durante 15 minutos.

Luego de la incubación, se retiró completamente el medio de cultivo de los platos de 293T y agitó la mezcla de transfección y colocaron los 6 mL de la mezcla en cada plato. Incubar durante 1 hora a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Luego de 1 hora de incubación, fueron adicionados 12 mL de medio DMEM + FBS al 7.5% a la mezcla de transfección (concentración final de FBS 5%) en cada plato y se incubó de 12 a 14 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Luego de la incubación la mezcla de transfección se retiró y se colocaron 12 mL de medio DMEM-F12 (suplementado con HEPES) con FBS al 5%. Se incubaron

durante aproximadamente 12 horas a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, revisando el cambio de pH. Luego del periodo de incubación, se revisó la expresión del reportero de GFP y se recuperó el sobrenadante de cada plato en tubos de 50 mL y colocar 12 mL de medio fresco con suero al 5%. Luego de 12 horas de incubación se realizó una nueva cosecha bajo las mismas condiciones señaladas en el punto anterior. Se realizó una tercera y última cosecha luego de 12 horas más.

### **CONCENTRADO DEL VECTOR LENTIVIRAL**

El volumen total debe ser colectado en tubos de 50 mL, debe ser filtrado con filtros de 0.45µm y debe mantenerse a 4°C hasta su uso (no más de 5 días luego de la tercera cosecha). Si se requiere guardar el sobrenadante por más tiempo, este puede ser concentrado por medio de centrifugación a 20.000 rpm durante 2 horas a 4°C. El virus debe resuspenderse en 500 µL de PBS (u otro buffer) + BSA 0.1%, debe congelarse rápidamente en hielo seco y debe ser mantenido a -80°C hasta su uso. La concentración del virus en 500 µL a partir de aproximadamente 36 mL. También puede utilizarse PEG, este ayuda a formar un pellet uniforme, y eluir de la misma manera.

### **TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS CON EL VECTOR LENTIVIRAL**

Se colocó medio fresco a las células que se va a transducir al menos 12 horas antes de la infección.

Se realizó una titulación del virus reportero utilizando diferentes proporciones de sobrenadante respecto al medio de cultivo (1:1, 1:2, 1:3) o con diferentes volúmenes de virus concentrado (p.ej: 10, 5 y 2 µL) durante 6 a 8 horas de infección en las células control.

Luego de la incubación con el virus se retiró el sobrenadante, y se lavó con medio temperado sin suero y se colocó medio fresco.

Se revisó la señal de GFP luego de 24 horas post-infección. La señal de GFP no debe ser excesiva y debe ser uniforme. La señal se midió por citometría de flujo. Se comparó la titulación de citometría con la amplificación de una secuencia consenso por medio de PCR en tiempo real.

Durante los ensayos se pretendió evaluar el efecto del suero fetal bovino (BFS) durante las producciones virales, pues este tenía efectos adversos sobre las producciones. Es por esto que se implementaron tres protocolos en donde el tiempo y la cantidad de suero eran las variables principales.

A continuación se presenta un cuadro que permite distinguir entre los 3 protocolos utilizados, con la metodología de Lípidos catiónicos, probados con la finalidad de delimitar con cuál de los tres utilizados se obtenía un título más alto, 0, 1, 2 y 3 son protocolos con modificaciones sobre el protocolo 0 arriba descrito.

<b>PROTOCOLO 0</b>	<b>PROTOCOLO 1</b>	<b>PROTOCOLO 2</b>	<b>PROTOCOLO 3</b>
1 hr. Con	1 hr. Con	1 hr. Con	1 hr. Con
6 ml. DMEM+ 90µl	6 ml. DMEM+ 90µl	6 ml. DMEM+ 90µl	6ml.OPTIMEM+
Transfast	Transfast	Transfast	90µlTransfast
+	+	+	+
11 hr. Con	11 hr. Con	11 hr. Con	7 hr. Con
12 ml. DMEM+SFB	12 ml. OPTIMEM	12 ml. OPTIMEM	12 ml. OPTIMEM
5%	+SFB 5%	+SFB 5%	sin SFB
	<b>RETIRAR</b>	<b>TRANSFECCIÓN</b>	
12 hr. DMEM+SFB	24hr.	24hr.	24hr.
5%	OPTIMEM+SFB	OPTIMEM+SFB	OPTIMEM+SFB
	2%	2% (Inact.)	2%(Inact.)
12 hr. Cosecha	12 hr. Cosecha	12 hr. Cosecha	12 hr. Cosecha
12 hr. Cosecha	12 hr. Cosecha	12 hr. Cosecha	12 hr. Cosecha

Cuadro 2. Muestra los tres protocolos utilizados para la fase de delimitación de protocolos.

## **2. ESTANDARIZACIÓN DE ENSAYOS DE CITOMETRIA, DNA Y RNA. TITULACIÓN POR ENSAYOS DE CITOMETRÍA-FACS**

Para la titulación por citometría, una vez realizada la infección, las células fueron despegadas utilizando tripsina al 0.025%, dejando la enzima actuar por entre 3 y 4 minutos, dentro de la incubadora a 37°C para después inactivar con medio, cualquier medio disponible funciona, siempre y cuando se mantenga la concentración de suero en un 20% para la inhibición de la enzima.

Una vez despegadas las células del plato de cultivo deben ser centrifugadas 1200 rpm por 5 minutos. Eliminar el sobrenadante y conservar el pellet, este debe ser resuspendido en 500 µl. de PBS, y agregar 180 µl de paraformaldehído, para fijar las células.

La adquisición con citómetro consiste en hacer pasar las células por un haz de luz, las células interactúan con este causando dispersión de la luz, basándose en la difracción de la luz en sentido frontal, se puede evaluar el tamaño de las células que pasan (parámetro denominado Forward Scatter), y al medir la reflexión de la luz de manera lateral se evalúa la granularidad o complejidad de estas (parámetro denominado Side Scatter), ambos parámetros son utilizados para el establecimiento de poblaciones cuyas características sean de interés. Una vez establecida la población de las DPSC se realizó la adquisición con citómetro FACSCAN, Becton Dickinson®. La adquisición bajo los parámetros normales, en el canal de FL1, permitiendo la adquisición de 10,000 eventos por muestra para cuantificar la fluorescencia de las DPSC.

Los porcentajes de fluorescencia fueron obtenidos a través del análisis con el software de distribución libre Cyflogic®, considerando las regiones correspondientes y tomando los porcentajes de fluorescencia de cada una de las muestras para la elaboración de patrones de comportamiento de la infección.

## **TITULACIÓN POR PCR TIEMPO REAL**

La titulación por tiempo real comprendió las siguientes etapas:

1. El diseño y prueba de oligos, que estuvieran dirigidos a secuencias constantes, que no fueran eliminados por el virus y permitieran determinar la presencia del

vector en cualquiera de sus etapas de transducción así como también después de su producción.

Para la primera fase se utilizaron los iniciadores descritos por Sastry *et al*, 2002, estos fueron diseñados utilizando las regiones de empaquetamiento/sitio de unión del iniciador (PBS) del HIV-1. Esta región fue elegida ya que se trata de una región esencial que está presente en la mayor parte de los vectores derivados de HIV-1, y puede por lo tanto ser usada como blanco para la titulación de una gran cantidad de vectores. Una vez con las secuencias correctas, se comprobó que en efecto, las secuencias pudieran ser utilizadas para titular el vector, para esto se obtuvo la secuencia de pLenti CMV GFP Puro del sitio <http://www.addgene.org> y se ingresó al software de diseño y prueba de iniciadores, FAST-PCR de PrimerDigital® junto con las secuencias, se llevó a cabo una simulación bajo las condiciones descritas en la literatura. La eficiencia de amplificación para ambas secuencias fue del 85%.

2. La elaboración de una curva con diferentes diluciones del DNA plasmídico, con la que fuera posible generar una curva estándar que permitiera conocer el número de integraciones presentes en el genoma por cada volumen de virus agregado. Una vez comprobada la eficiencia para el plásmido por PCR virtual, el par de secuencias fue ordenado a Sigma-Aldrich Biotechnology®, para el diseño de los oligos.

<b>Nombre del oligo</b>	<b>Tamaño (bases)</b>	<b>Tm°</b>	<b>nmol</b>	<b>Secuencia (5'-3')</b>
<b>Lentiter-F</b>	21	65.3	37.4	ACCTGAAAGCGAAAGGGAAAC
<b>Lentiter-R</b>	23	66.3	41.2	CACCCATCTCTCTCCTTCTAGCC

Cuadro 3. Iniciadores utilizados para la titulación por tiempo real, las regiones de empaquetamiento/sitio de unión del iniciador (PBS) del HIV-1.

Para el re-hidratamiento de los oligos, primero fue necesario, consultar la cantidad de nanomoles de los oligos recibidos y realizar el cálculo para poder llevar a 50 µM.

Para **Lentiter-F**: Con una concentración de **37.4** nanomoles

Necesarios  $\frac{50 \text{ nanomoles}}{1 \text{ litro}}$  entonces sabiendo que:  $1 \mu\text{mol} = 1000 \text{ nmoles}$

Realizando el siguiente calculo:

$$37.4 \text{ nmoles} \left( \frac{1 \mu\text{mol}}{1000 \text{ nmoles}} \right) \left( \frac{1 \text{ Litro}}{50 \mu\text{moles}} \right) \left( \frac{100,000 \mu\text{l}}{1 \text{ Litro}} \right) = 748 \mu\text{l}$$

Cantidad de agua para tener 50  $\mu\text{M}$  por Litro = **748  $\mu\text{l}$**

Este calculo se realizo de la misma manera para el oligo Lentiter-R.

Para la elaboración de una curva estándar con diferentes diluciones del plásmido se utilizó, KAPA SYBR® FAST de kappa Biosystems en las siguientes cantidades:

	<b>Stock</b>	<b>Rx</b>	<b>1</b>	<b>20</b>
<b>Agua</b>	-	-	3.80	76.00
<b>SyBrGreen</b>	2	1	5.00	100.00
<b>DNA ng/<math>\mu\text{l}</math></b>	10	1	1.00	20.00
<b>Primer f <math>\mu\text{M}</math></b>	50	0.5	0.10	2.00
<b>Primer r <math>\mu\text{M}</math></b>	50	0.5	0.10	2.00

Cuadro 4. Reacciones de tiempo real para la elaboración de la curva estándar

## EXTRACCIÓN DE DNA

Para la extracción de DNA se utilizó el kit Zymo Fungal/Bacterial DNA Kit™ siguiendo los pasos del protocolo incluido (**ver anexo**) en DPSC 24 horas después del primer contacto con el vector lentiviral.

## TITULACIÓN CON DNA POR TIEMPO REAL

Para la titulación con DNA se utilizaron las mismas condiciones de amplificación de la curva estándar así como las mismas concentraciones de reacción descritas en la cuadro 4.

## EXTRACCIÓN DE RNA

Para la extracción de RNA se utilizó el kit RNeasy Midi prep ® de Qiagen , siguiendo los pasos del protocolo incluido, (**ver anexo**) después de 24 horas de entrar en contacto con el virus.

## TITULACION CON RNA POR TIEMPO REAL

Para la titulación en tiempo real con RNA se llevaron a cabo utilizando KAPA SYBR® FAST-RT de kappa Biosystems y utilizando las siguientes reacciones:

	<b>Stock</b>	<b>Rx</b>	<b>1</b>	<b>21</b>
<b>Agua</b>	-	-	0.60	12.60
<b>SyBrGreen</b>	2	1	5.00	105.00
<b>Transcrip-Rev</b>	50	1	0.20	4.20
<b>DNA ng/μl</b>	10	4	4.00	84.00
<b>Primer f μM</b>	50	0.5	0.10	2.10
<b>Primer r μM</b>	50	0.5	0.10	2.10

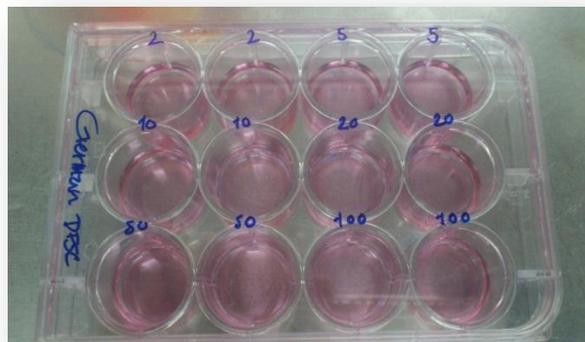
Cuadro 5. Reacciones de tiempo real para la titulación con RNA

Para los ensayos de tiempo real se utilizó el Rotor-Gene 6000 de Corbett Life Science, para el análisis de resultados el software del mismo nombre.

Para todos los análisis de datos estadísticos y gráficos se utilizó el software GraphPad Prism 5™ de GraphPad Software, Inc.

## TITULACIÓN DEL VECTOR LENTIVIRAL UTILIZADO COMO REPORTERO EN LOS DISTINTOS ENSAYOS DE REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS HUMANAS.

Para realizar la titulación del vector lentiviral reportero de GFP se debió tomar en cuenta que de acuerdo al diseño experimental (ver figura 11) es necesario contar con suficiente volumen del vector para realizar las infecciones/transducciones, por tanto se prepararon varias producciones simultáneas para que, a partir de una sola transfección fuera posible tener la cantidad de virus necesaria para los tres ensayos, es decir, cantidad necesaria para realizar la transducción en DPSC, realizar la adquisición por citometría de flujo, la extracción de DNA para PCR-Tiempo Real y finalmente la cantidad de virus para realizar la extracción de RNA y realizar la titulación por PCR-Tiempo Real. De la misma manera fue necesario mantener en cultivo DPSC suficientes para realizar los dos métodos diferentes de titulación, para esto se utilizaban placas de cultivo de 12 pozos, para cultivar en simultáneo las células destinadas al análisis FACS y las destinadas a extracción de DNA para titulación por tiempo real.



**Fig. 12. Fotografía de DPSC en cultivo,** Algunos de los tratamientos fueron asignados de la manera en que se presentan en la fotografía. De este modo, fue posible asegurarse que se tuvieran suficientes células tanto para el ensayo de citometría (análisis FACS) y la titulación por DNA. En algunos casos se utilizó más de una caja con esta distribución para los ensayos que requirieron más de una repetición.

## **ALMACENAMIENTO DEL VECTOR LENTIVIRAL**

Tomando en cuenta el hecho que el virus es altamente sensible a la temperatura, los experimentos fueron planeados de manera que no tuviera que ser almacenado de acuerdo a los protocolos existentes que aconsejan que esto se realice entre los  $-70^{\circ}\text{C}$  y  $-80^{\circ}\text{C}$ , en vez de esto el virus se almacenó de 2 a 5 días a  $4^{\circ}\text{C}$  para los experimentos de titulación simultánea, con la intención de evitar el congelamiento y descongelamiento constante.

### 3. RESULTADOS

#### CARACTERIZACION PLÁSMIDOS **psPAX2**, **pMD2.G**, **Plenti CMV GFP Puro**.

Se realizó la cuantificación de ácidos nucleicos contenida en el producto purificado, utilizando el espectrofotómetro Smartspec ®, factor de dilución 1:50 que arrojó los siguientes datos:

Plásmido	Concentración µg/ml
<b>psPAX2</b>	651.8564
<b>pMD2.G</b>	428.5509
<b>Plenti CMV GFP Puro (658-5)</b>	611.4630

Cuadro 6. Concentración en µg/ml en los plásmidos purificados, factor de dilución 1:50, cociente de proteína A260/A280=1.50.

Posteriormente se llevó a cabo una selección de enzimas de restricción para la caracterización de los plásmidos purificados, para esto se realizaron los siguientes pasos:

- Se consultó la biblioteca del sitio web <http://www.addgene.org/> donde los plásmidos **psPAX2**, **pMD2.G** y **Plenti CMV GFP Puro (685-5)** fueron adquiridos para verificar los sitios de corte correspondientes a cada uno y seleccionar las enzimas de restricción disponibles.
- Para el ensayo de linearización se utilizaron 800 ng de DNA por reacción de 20 ul.

Para **psPAX2** enzima de corte único EcoRV

Para **pMD2.G** enzima de corte único HindIII

Para **Plenti CMV GFP Puro (685-5)** enzima de corte único Sall

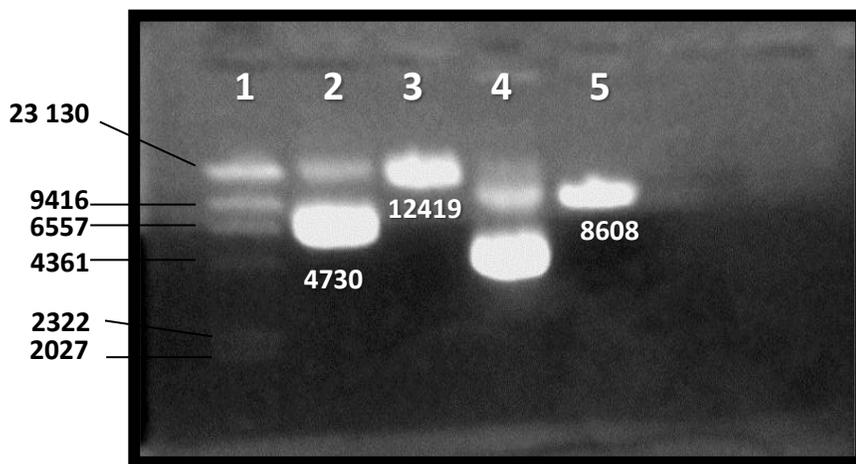
Reacción 20 $\mu$ l	Volumen (reacción)
Agua	14 $\mu$ l
Buffer 10X	2 $\mu$ l
Enzima 10	1 $\mu$ l
BSA 100X	0.2 $\mu$ l
DNA	600/800 ng

Cuadro 7. Reacción para llevar a cabo ensayo de linearización, se utilizaron 800 ng. de DNA para una reacción de 20  $\mu$ l, se realizaron 3 reacciones, una para la caracterización de cada plásmido.

- Se procedió a la reacción en tiempo de digestión durante 2hrs. a 37 °C en termoblock, thermolyne dri-bath ®
- Al término de la digestión, se elaboró un gel de agarosa al 0.8 %, en donde fueron corridas las muestras, cargando de 2.5 a 5  $\mu$ l de DNA, se corrió durante 1.5 horas a 60 V.



**Figura 13. Gel de agarosa 0.8%**, en donde se muestran los productos de la linearización de los plásmidos psPAX2 y pMD2.G con las enzimas de corte EcoRV para caracterizar a **psPAX2** y **pMD2.G** con HindIII. Los números en la imagen representan pb (pares de bases) Carril 1) Marcador de peso molecular fago Lambda HindIII Ladder 23,130 pb 2) pMD2G cortado con HindIII 3) psPAX2 4) psPAX2 cortado con EcoRV 5) pMD2.G



**Figura 14. Gel de agarosa 0.8%**, se muestran los productos del ensayo de restricción, con las enzimas de corte para caracterizar a **Oksim** y **e-GFP** con XbaI. Carril 1) Marcador de peso molecular fago Lambda HindIII Ladder 23,130 pb 2) GfP cortado con XbaI 3) Oksim 4) Oksim cortado con XbaI 5) GfP

## ESTANDARIZACIÓN PARA ENSAYOS DE CITOMETRÍA: DETERMINACIÓN DEL USO DE SOBRENADANTE Y CONCENTRADO.

Con el propósito de estandarizar los ensayos de citometría, se llevó a cabo una transfección para producir un vector lentiviral con los plásmidos de empaque y envoltura **psPAX2** y **pMD2.G** que contiene el transgen **Plenti CMV GFP Puro (685-5)** De acuerdo al protocolo no. 0 (Ver material y métodos).

### TITULACIÓN DEL SOBRENADANTE

Para la estandarización, se cultivaron en un plato de 100mm aproximadamente 1,000,000 de DPSC, una vez alcanzaron confluencia deseada de entre el 70 y 90% (4 millones de células aproximadamente) fueron despegadas utilizando tripsina al 0.025%, y sembradas nuevamente en una caja de cultivo adherente de 6 pozos *nunc*®, distribuyéndolas proporcionalmente en cada pozo (285,714 células por cada pozo), las células fueron transducidas con diluciones del sobrenadante de la segunda cosecha, para diluir el virus se utilizó medio reducido en suero para cultivo celular OPTI-MEM Glutamax GIBCO® para llevar a un volumen final de 1ml cada una de las diluciones, y utilizando la misma cantidad de células no infectadas como control negativo. Se realizó una titulación del virus reportero utilizando diferentes proporciones de sobrenadante respecto al medio de cultivo (1:1, 1:2, 1:3, etc.). Las DPSC estuvieron en contacto con el vector durante 24 horas, posteriormente fueron tomadas fotografías de los tratamientos (diluciones seriadas del sobrenadante) y se les preparó para la adquisición con citómetro.

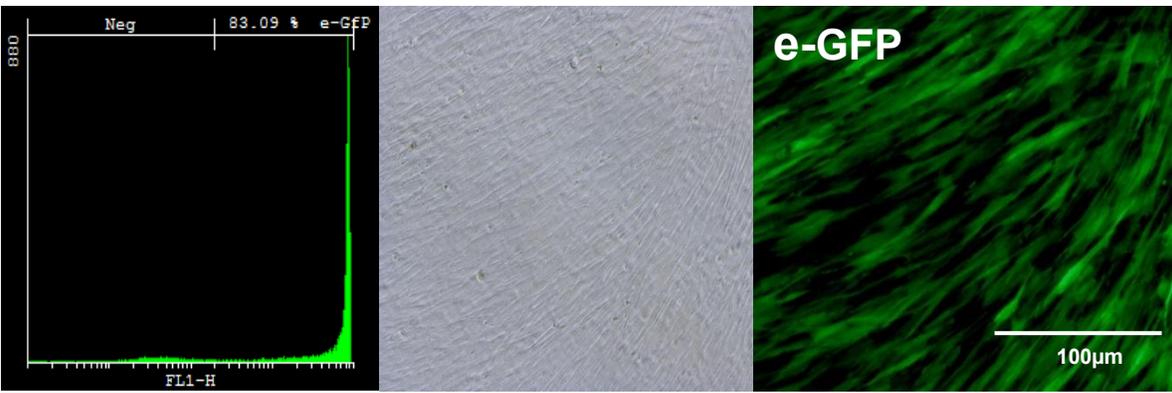
A)



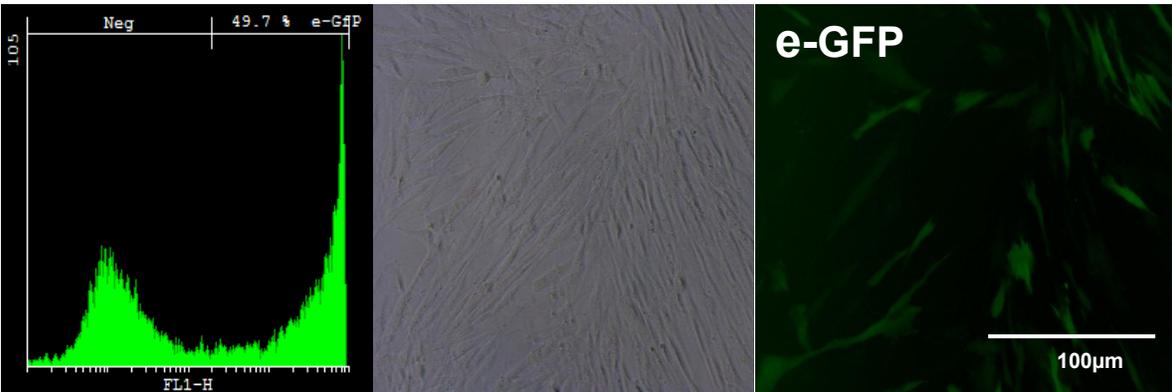
B)



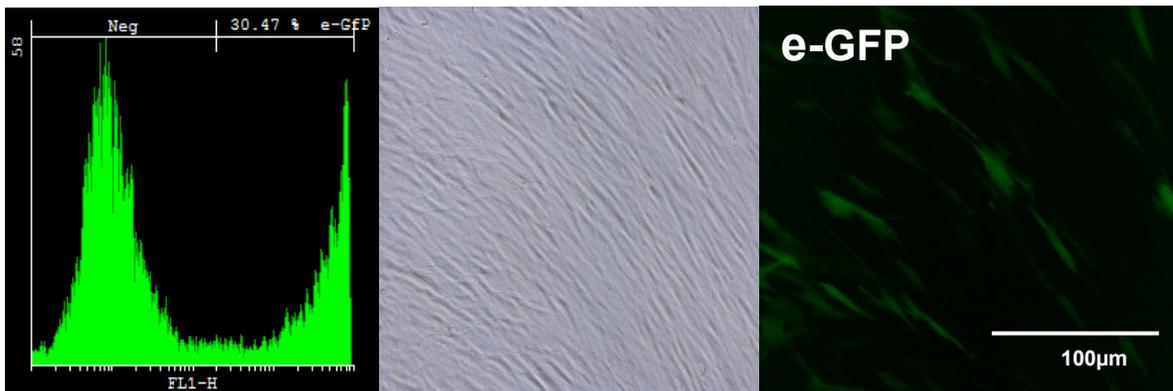
C)



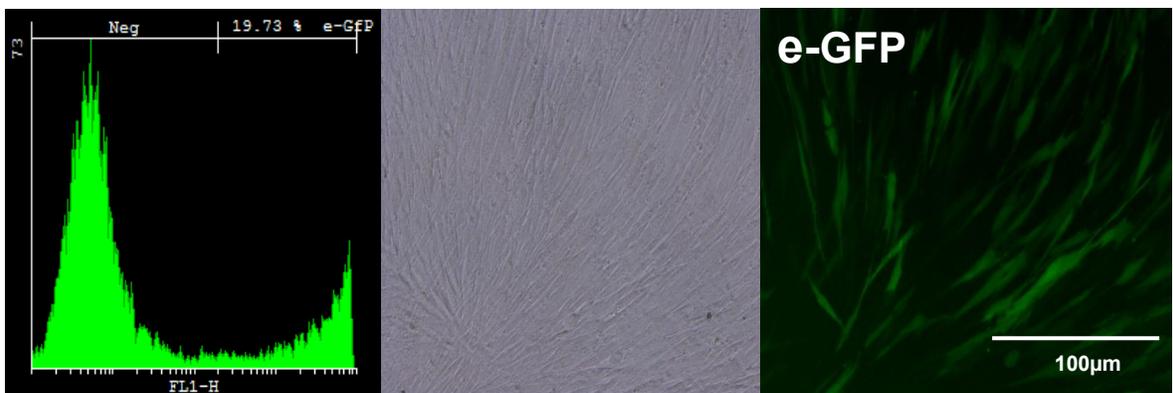
D)



E)



F)



**Fig.15. DPSC 24 horas después de la transducción con diluciones seriadas de sobrenadante**, cada inciso muestra un conjunto de imágenes en donde la primera corresponde al análisis realizado después de la adquisición con FACS con el software Cyflogic llevado a cabo para determinar el porcentaje de fluorescencia, junto con la respectiva fotografía con filtro de fluorescencia y contraste de fase, se realizaron dos replicas para cada tratamiento, se puede observar la correspondencia de los tratamientos con la señal de fluorescencia **A)** 1:1 (500/500) **B)** 1:2 (333/666) **C)** 1:3 (250/750) **D)** 1:5 (200/800) **E)** 1:10 (100/900) **F)** 1:20 (050/950).

Después de 12 horas de entrar en contacto con el virus se despegaron las células con tripsina al 0.025% y se prepararon para adquisición con citómetro de flujo (**ver materiales y métodos**)

Dilución	% e-GfP		
Replica →	1	2	Media
<b>Control</b>	0	0	0
<b>1:1</b>	93.02	92.38	92.70
<b>1:2</b>	89.12	87.95	88.53
<b>1:3</b>	83.09	82.35	82.72
<b>1:5</b>	49.7	47.87	48.78
<b>1:10</b>	30.47	30.39	30.43
<b>1:20</b>	19.73	18.69	19.21

Cuadro 8. Porcentajes de visibilidad de e-GfP para la titulación con diluciones del sobrenadante, se realizaron dos repeticiones del ensayo de citometría.

## % de GFP/ diluciones

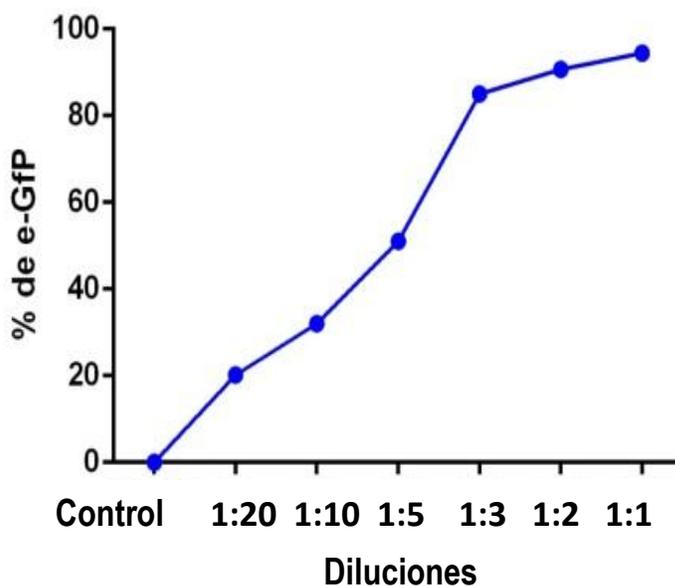
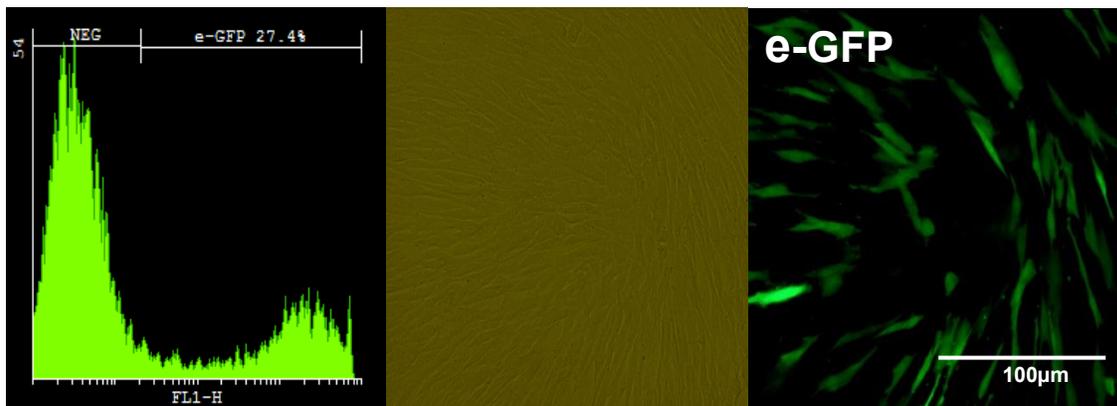


Fig 16. Porcentaje de fluorescencia 24 horas después de la transducción, es notable la tendencia a la saturación de la señal de GFP

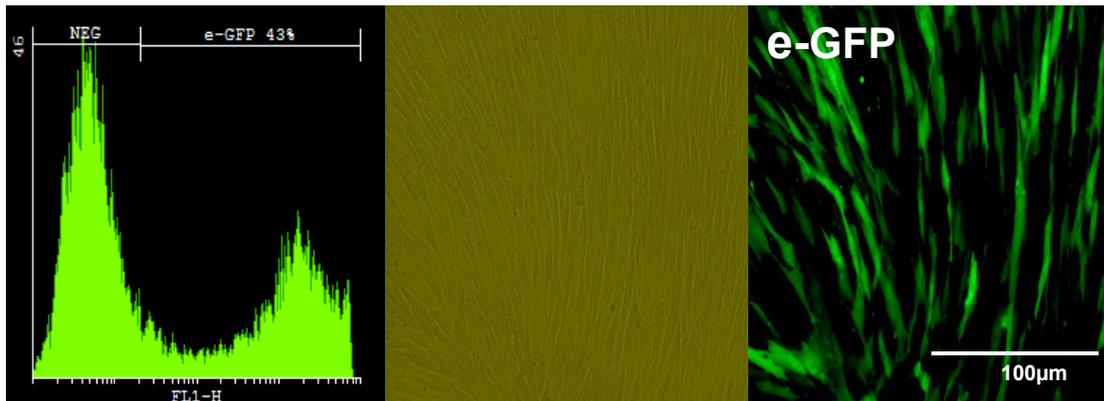
## TITULACIÓN DEL CONCENTRADO

Se llevó a cabo una nueva producción viral con el propósito de establecer una gráfica de titulación, esta vez con el concentrado de las 3 cosechas, (**ver materiales y métodos**), una vez producido el virus, se llevó a cabo la transducción en DPSC, para esto se pusieron en cultivo 5 millones (5 viales de DPSC previamente aisladas y expandidas) de células con optimem+ BFS 10% y las cuales fueron cultivadas en tres cajas de 12 pozos repartiendo la cantidad entre 10 se realizó la transfección utilizando el protocolo 0.

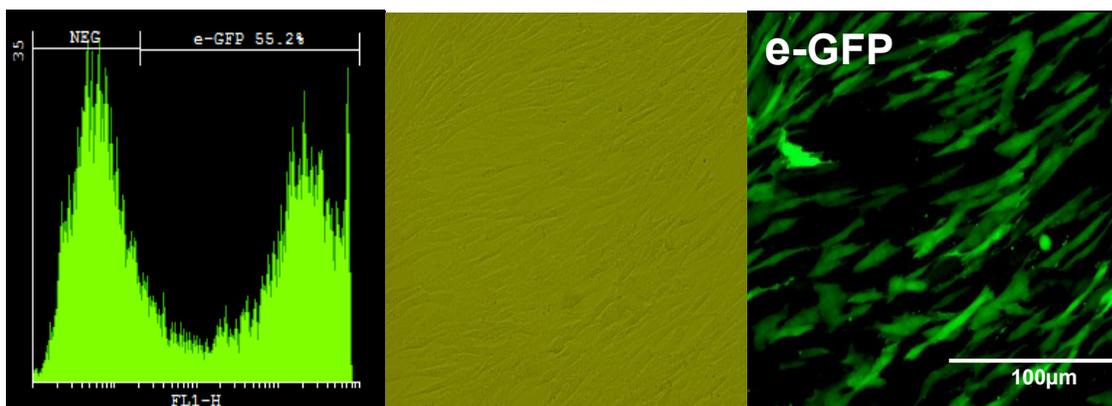
A)



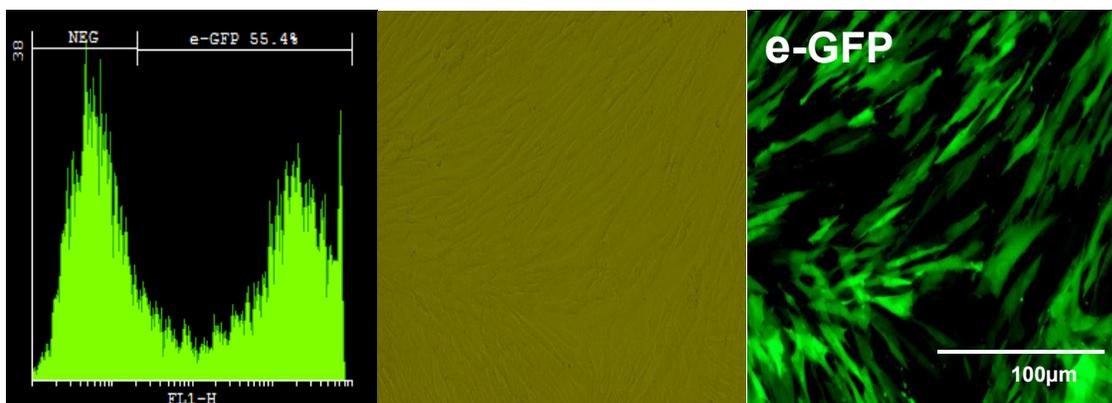
B)



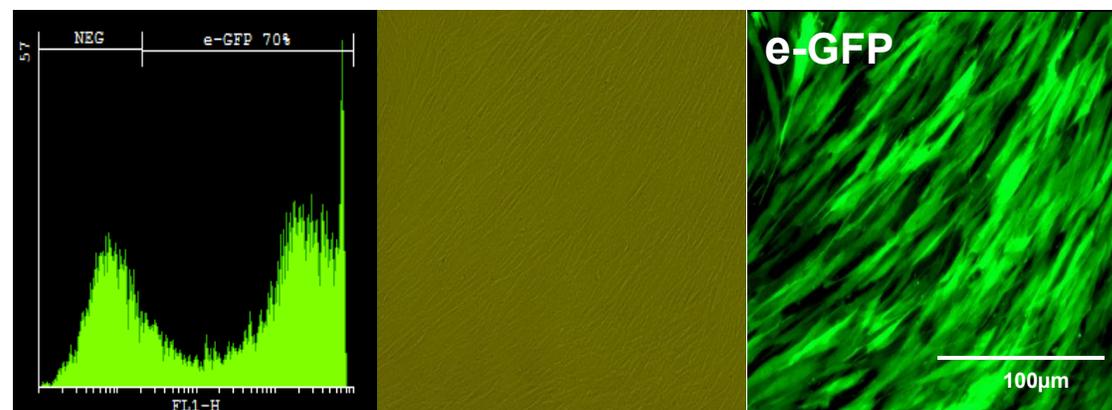
C)



D)



E)



**Fig.17. Fotografías tomadas 24 horas después de la transducción**, cada inciso muestra un conjunto de imágenes en donde la primera corresponde al análisis realizado después de la adquisición con FACS con el software Cyflogic determinar el porcentaje de fluorescencia, junto con la respectiva fotografía con filtro de fluorescencia y contraste de fase se muestran los volúmenes con las se realizó la transducción con concentrado del vector (µl). Se muestran las adquisiciones realizadas con citómetro de flujo en FL1. A) 2 µl B) 4µl C) 6 µl D) 8µl E) 10µl.

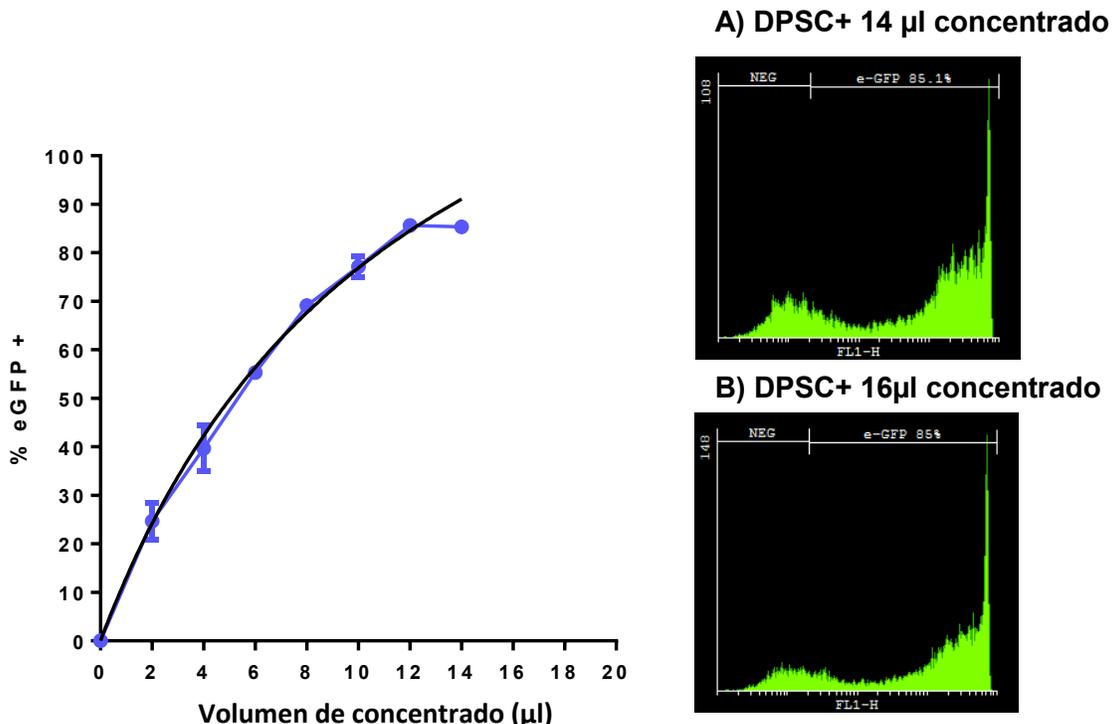


Figura 18. Grafica muestra el porcentaje de células positivas para GfP contra los volúmenes de concentrado empleados, es observable un comportamiento exponencial de la infección. Para el grafico se utilizaron los valores arrojados por el citómetro de flujo, sin embargo no se incluyen las fotografías correspondientes a las señales de 12 µl 14 µl y 16 µl incisos A y B debido a que ya no existe una diferencia significativa en las imagenes como el grafico puede comprobar. El grafico fue linearizado con un curva de saturación (Michaelis-Menten) con Graphpad prism 5.

### ESTANDARIZACIÓN PARA PRODUCCIÓN DE VECTORES LENTIVIRALES COMPETENTES Y CON UN ALTO TÍTULO: DEMILITACIÓN DE PROTOCOLOS.

Cuando se realiza una transfección es posible comprobar que son producidos vectores estables, e incluso la capacidad que tiene el virus de infectar, pues las células 293 T utilizadas comienzan a presentar fluorescencia, hecho que indica que existe GFP funcional. Antes de comenzar con la titulación se comprobó mediante observación de la fluorescencia relativa que presentan las células de empaquetamiento que las dos técnicas, Lípidos catiónicos (Transfast-promega) y fosfato de calcio (Millipore Merck) utilizadas no introdujeran alguna variable a los ensayos para lo cual se compararon ambas técnicas de transfección y se comprobó que, en efecto, ambos métodos pueden producir vectores competentes. Ambos protocolos no muestran, a simple vista diferencias notorias respecto a la capacidad de producir vectores competentes.



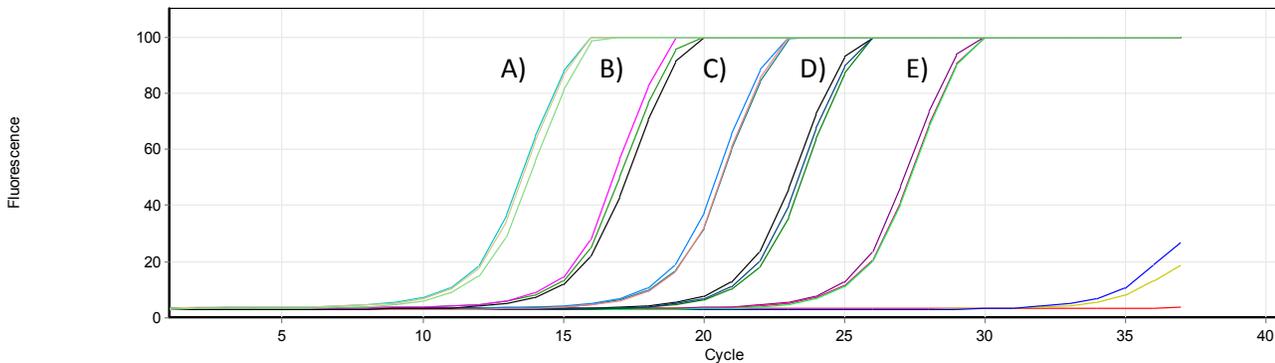
**Fig 19. Fotografías de las células 293 T**, utilizadas en la transfección durante la producción de vectores lentivirales que expresan la proteína GFP, 12 horas después de realizada la transfección, **A)** imagen tomada de una transfección realizada con el protocolo utilizando transfast. **B)** imagen tomada de una transfección utilizando el protocolo de fosfato de calcio.

### **OBTENCIÓN DE UNA CURVA STANDARD CON DIFERENTES DILUCIONES DE DNA PLASMÍDICO.**

Con el propósito de titular mediante DNA, se decidió que la titulación se realizaría por tiempo real, extrayendo DNA de las células infectadas, al mismo tiempo que se verificaba el funcionamiento óptimo de los oligos, se construía una curva estándar que permitiera conocer el ciclo de amplificación específico correspondiente a cierta cantidad de DNA plasmídico y por ende, el número de copias de las secuencias ahora integradas del vector lentiviral, en este caso de GFP. Para la elaboración de la curva estándar se llevaron a cabo diluciones seriadas del plásmido. Utilizando el número de Avogadro se llevaron a cabo los cálculos correspondientes utilizando la siguiente formula:

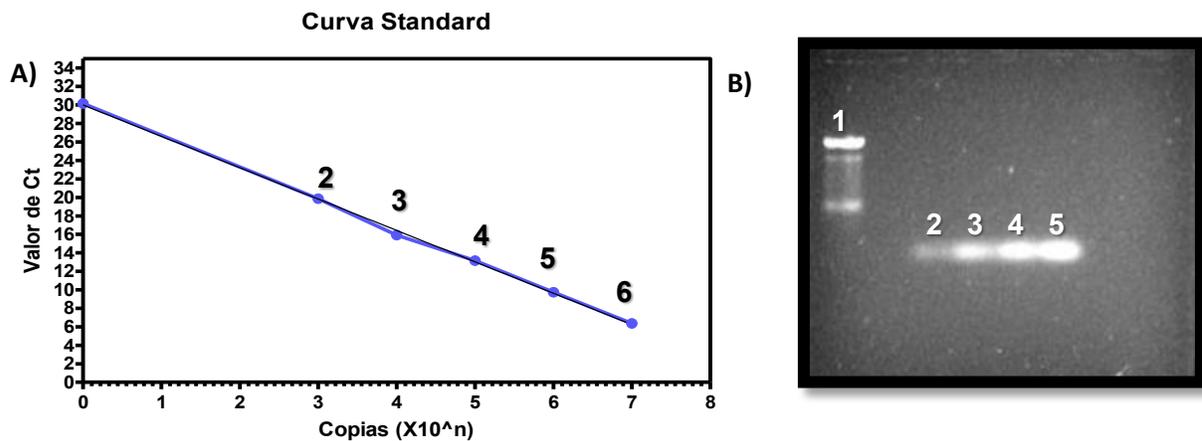
$$(X \text{ g } / \mu\text{l DNA} / [\text{tamaño del plásmido en pb} \times 660]) \times 6.022 \times 10^{23} = Y \text{ moléculas} / \mu\text{l}$$

Finalmente llevando a cabo la reacción bajo las condiciones de amplificación descritas en materiales y métodos.



**Fig.20** Gráfico de la reacción de tiempo real realizada con diferentes diluciones de plásmido bajo las condiciones de amplificación descritas en la metodología. Diluciones de plásmido: **A)**10<sup>7</sup> **B)**10<sup>6</sup> **C)**10<sup>5</sup> **D)**10<sup>4</sup> **E)** 10<sup>3</sup>

Una vez realizada la reacción de tiempo real, se analizaron los datos mediante el software Rotor Gene 6000 y se obtuvo el CT de cada una de las diluciones, se procedió a realizar una gráfica comparando los valores de CT con el número de copias estimadas en cada dilución, la gráfica fue linealizada utilizando GraphPad Prism 5 y se realizó un gel para confirmar el ensayo.



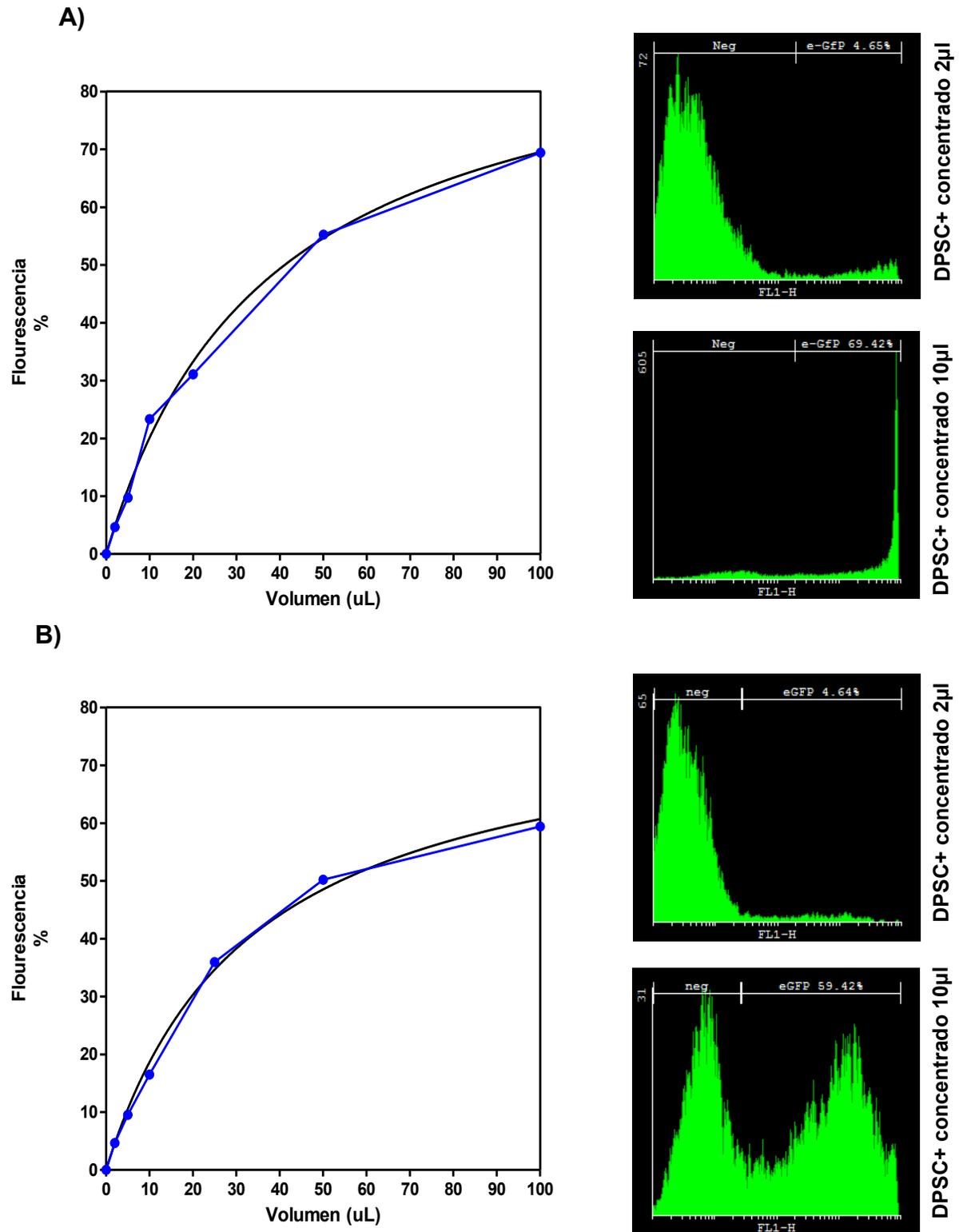
**Fig. 21. A)** Curva estándar realizada a partir de los valores de Ct de DNA plasmídico. **B)** Gel de agarosa al 0.8 % donde se aprecia que el tamaño de los productos de reacción es el mismo y corresponde al tamaño del plásmido, la intensidad del brillo corresponde con la cantidad de plásmido presente en las diluciones. 1) Marcador de peso molecular 2)10<sup>3</sup> 3)10<sup>4</sup> 4)10<sup>5</sup> 5)10<sup>6</sup> 6)10<sup>7</sup>.

## **IMPLEMENTACIÓN DE PROTOCOLOS: EL SUERO FETAL BOVINO Y SU RELACIÓN CON LA INACTIVACIÓN DEL VECTOR.**

Una vez realizada la curva estándar se procedió a realizar la titulación del vector, de acuerdo al diseño experimental (ver materiales y métodos) la titulación debe realizarse en simultáneo por citometría y adicionalmente una (o ambas) de las técnicas de titulación por tiempo real con DNA y con RNA a partir del vector producto de una sola transfección.

Durante las producciones simultáneas se observó:

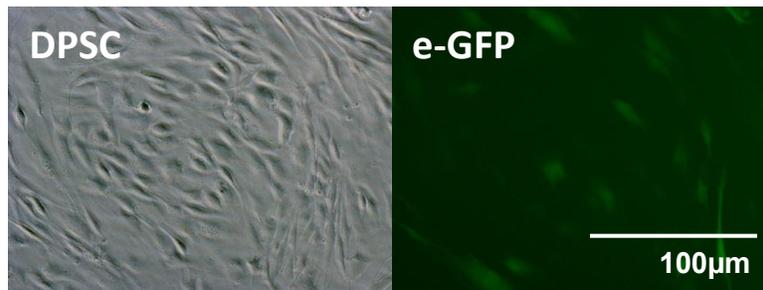
- A pesar de que las producciones eran funcionales, comprobado mediante citometría, las producciones simultáneas destinadas a la titulación por DNA/RNA realizadas posteriormente perdían su actividad al entrar en contacto con el medio de cultivo de las DPSC, el medio de cultivo contenía suero DMEM F12+BFS 10% o bien OPTIMEM +BFS 5%.
- El medio de transfección para ambas técnicas contiene suero, las producciones simultáneas realizadas con el protocolo 0 no resultaban funcionales en todos los casos.
- El congelar el vector a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su almacenamiento resulta en una pérdida gradual del título viral al verse expuesto a ser congelado y descongelado constantemente, es por esta razón que el vector era almacenado de 2 a 5 días después de la última cosecha a  $4^{\circ}\text{C}$  para ser utilizado en un rango corto de tiempo, a pesar de estas medidas existía una pérdida del título viral.



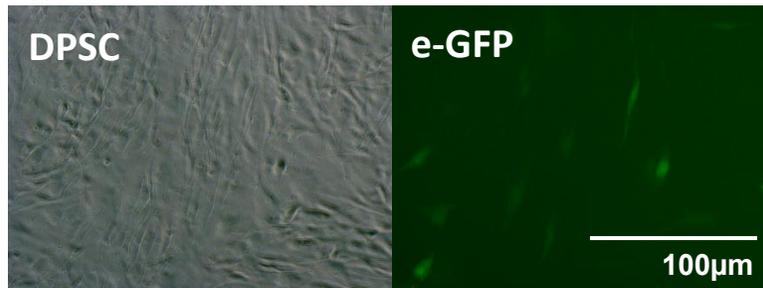
**Fig 22.** Transducción de DPSC con el vector, los gráficos muestran dos producciones virales diferentes. **A)** imágenes del análisis con Cyflogic de FACS que muestra la señal de GFP para los tratamientos de 20  $\mu$  y 100  $\mu$  **B)** análisis con Cyflogic de la adquisición por FACS que muestra la señal de GFP para los tratamientos 20  $\mu$  y 100  $\mu$ . Ambos juegos de imágenes confirman que el vector es funcional sin embargo este no es estable ya que las producciones simultaneas que se realizaron junto la mostrada resultado inactivada.

Es por esta razón que se implementaron protocolos 1, 2, 3 (ver materiales y métodos) con el propósito de evaluar la función del BFS durante el proceso de transfección. Para esto se realizaron 3 transfecciones con cada uno de los protocolos de acuerdo con las condiciones del cuadro 2. Realizadas las cosechas se hicieron transducciones con el sobrenadante de DPSC y se evaluó la fluorescencia relativa que presentaban las células. A continuación se presentan imágenes de las transducciones realizadas, se muestra solo una fotografía por protocolo.

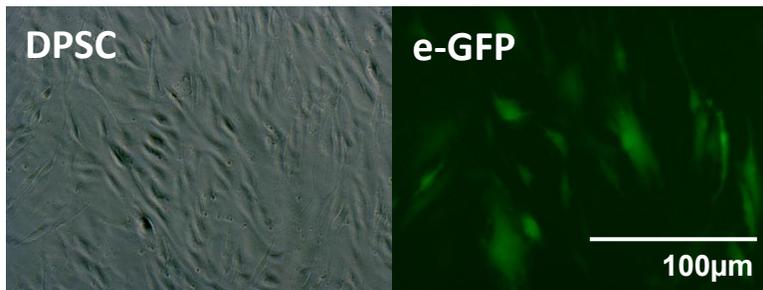
A)



B)



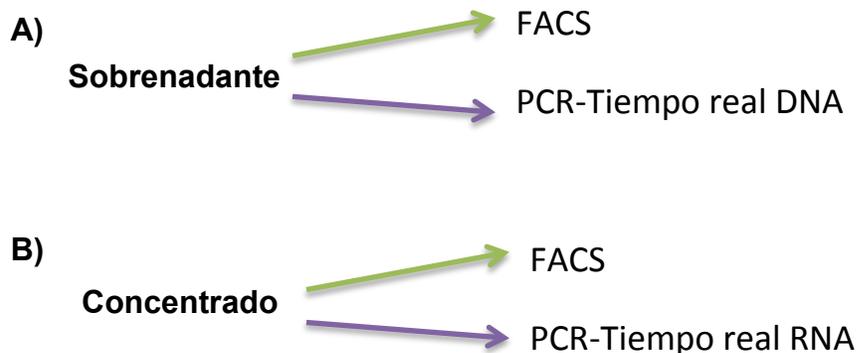
C)



**Fig 23. Fotografías tomadas 12 horas después de llevada a cabo la transfección** para los tres protocolos implementados con el propósito de llevar a comprobar la fluorescencia relativa con diferentes cantidades de BFS. A) protocolo 1 cosecha 2 B) Protocolo 2 Cosecha 2 C) Protocolo 3 Cosecha 1. Nótese que el protocolo 3 presenta una mayor fluorescencia en su primera cosecha que los protocolos 1 y 2 en su segunda cosecha.

## TITULACIÓN DEL VECTOR LENTIVIRAL UTILIZADO COMO REPORTERO EN LOS DISTINTOS ENSAYOS DE REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS HUMANAS.

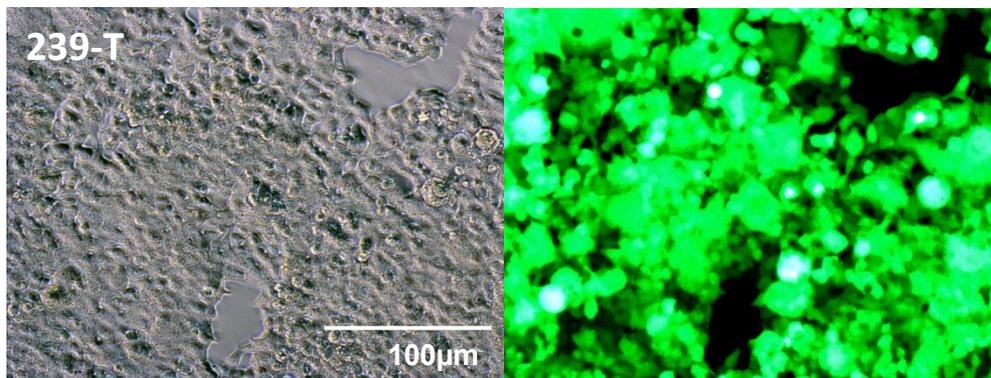
Una vez que el protocolo más adecuado fue seleccionado (Protocolo 3 en el caso de lípidos catiónicos o el protocolo de fosfato de calcio) se llevó a cabo la titulación. Para realizar la titulación, como se ha mencionado en la parte de metodología resulta importante generar cosechas simultáneas para ser evaluadas con más de un método de titulación, se realizaron entonces dos producciones virales simultáneas, la primera con el propósito de evaluar el título mediante FACS y PCR-tiempo Real con RNA de concentrado de 3 cosechas del vector. La segunda pretendió evaluar mediante FACS y PCR-Tiempo real con DNA extraído de las células transducidas que estuvieron en contacto con el sobrenadante de la segunda cosecha por 24 horas. A continuación se presenta un esquema que ilustra la manera en que se realizó la titulación del vector reportero de GFP.



**Figura 24.** Se ilustra la forma en que se realizó la titulación del reportero de expresión de GFP con **A)** sobrenadante y **B)** concentrado. Como se puede observar ambas modalidades de uso del vector fueron tituladas con FACS, sin embargo en el caso del concentrado el tiempo real se realizó extrayendo RNA directamente de los volúmenes seriados del concentrado de 3 cosechas de una producción realizada en simultaneo utilizada para transducir las DPSC. En el caso del sobrenadante, se realizó un ensayo de PCR-Tiempo real extrayendo DNA de las DPSC transducidas con volúmenes seriados del sobrenadante de la segunda cosecha de una producción realizada

Se descongelaron y cultivaron células 293-T y se llevaron hasta el 70% de confluencia en una caja de 100mm (por transfección). Fueron despegadas con tripsina al 0.025% y cultivadas en platos de 100mm hasta llegar al 70% de confluencia para realizar la transfección se realizaron 3 transfecciones simultáneas. Por separado se cultivaron aproximadamente 4 millones de DPSC y posteriormente fueron pasadas a una caja de 12 pozos donde se les mantuvo por dos días en expansión hasta su exposición con el vector.

Finalmente se llevó a cabo la transfección utilizando fosfato de calcio.



**Fig.25 .Fotografías de células 293 T tomadas durante la segunda cosecha después de realizada la transfección con fosfato de calcio.** Existe una alta señal de fluorescencia lo que indica que el vector se está produciendo de manera funcional las células 293 T están siendo infectadas con el vector.

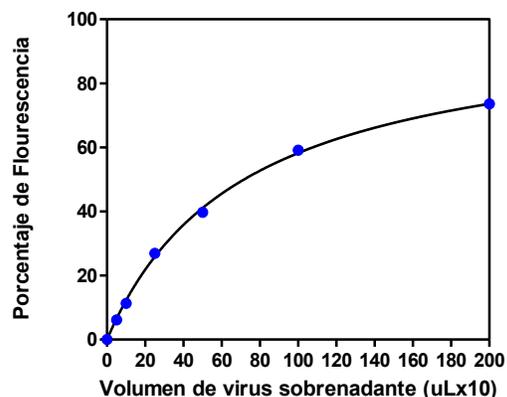
Para realizar la transducción de las DPSC se utilizó sobrenadante de la segunda cosecha utilizando los volúmenes **20, 50, 100, 200, 500,1000, 2000**  $\mu$ l del vector (GFP) para la titulación por FACS y la titulación por DNA.

Por otro lado se realizó la transducción de DPSC utilizando el concentrado de las 3 cosechas con los volúmenes 2, 5, 10, 25, 50, 100  $\mu$ l del vector (GFP) para la titulación con FACS y la titulación por RNA.

## TITULACIÓN POR CITOMETRÍA

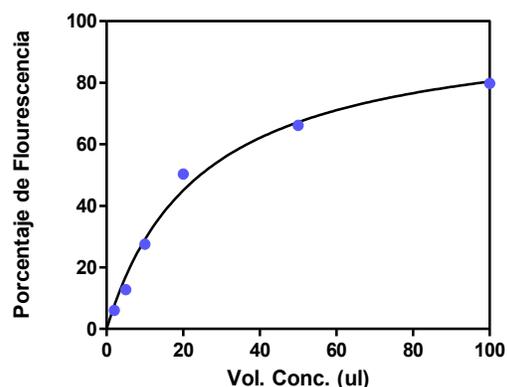
Se realizó la adquisición con citómetro FACSCAN, Bencton Dickinson ®, en el canal de FL1, permitiendo la adquisición de 10,000 eventos por muestra. Se realizó el análisis de los datos obtenidos con el software Cyflogic y se elaboró la siguiente grafica utilizando GraphPad Prism 5.

### A) SOBRENADANTE



% GFP	Volumen Sobrenadante
6.17	50
11.34	100
26.94	200
39.76	500
59.14	1000
73.62	2000

### B) CONCENTRADO

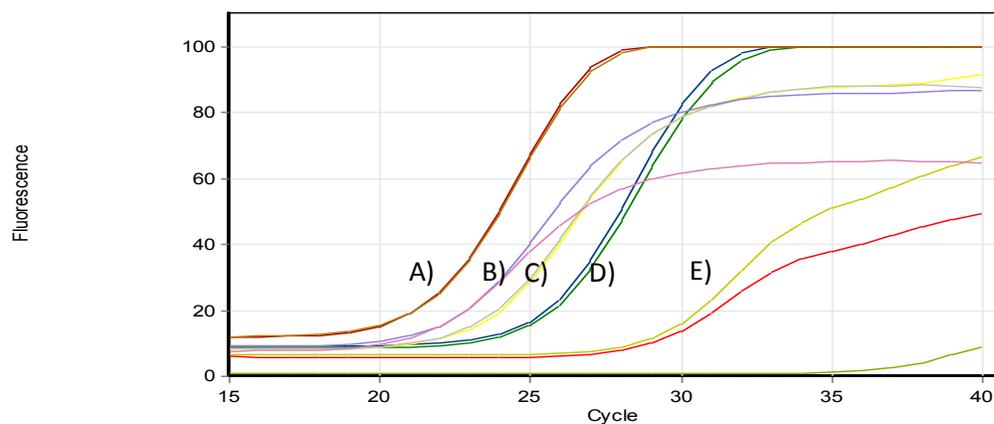


% GFP	Volumen Concentrado
5.99	2
12.76	5
27.56	10
50.31	25
66.14	50
79.80	100

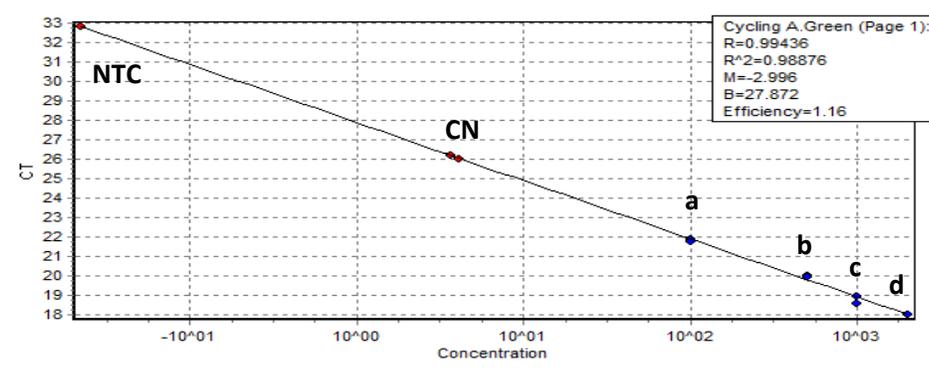
Fig. 26. El análisis de llevo a cabo con el software GraphPad Prism 5 la gráfica fue posteriormente linealizada utilizando una función de curva de saturación que corresponde adecuadamente con el comportamiento de la señal de GFP A) Grafica que muestra la señal de fluorescencia de GFP con los diferentes volúmenes del sobrenadante utilizado 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 ( $\mu$ l) de la segunda cosecha con el protocolo de fosfato de calcio (ver materiales y métodos) B) Grafica que muestra la señal de fluorescencia de GFP con los diferentes volúmenes del concentrado utilizado 2, 5, 10, 20, 50, 100 ( $\mu$ l) la concentración del vector se hizo siguiendo los pasos descritos en la metodología (ver materiales y métodos) .

## TITULACION POR TIEMPO REAL: DNA

Las DPSC utilizadas fueron transducidas en simultáneo con las utilizadas para en análisis FACS, posteriormente cultivadas hasta tener una cantidad considerable para llevar a cabo la extracción de DNA con el protocolo descrito en la metodología y cuyos pasos se encuentran descritos con detalle en el anexo.



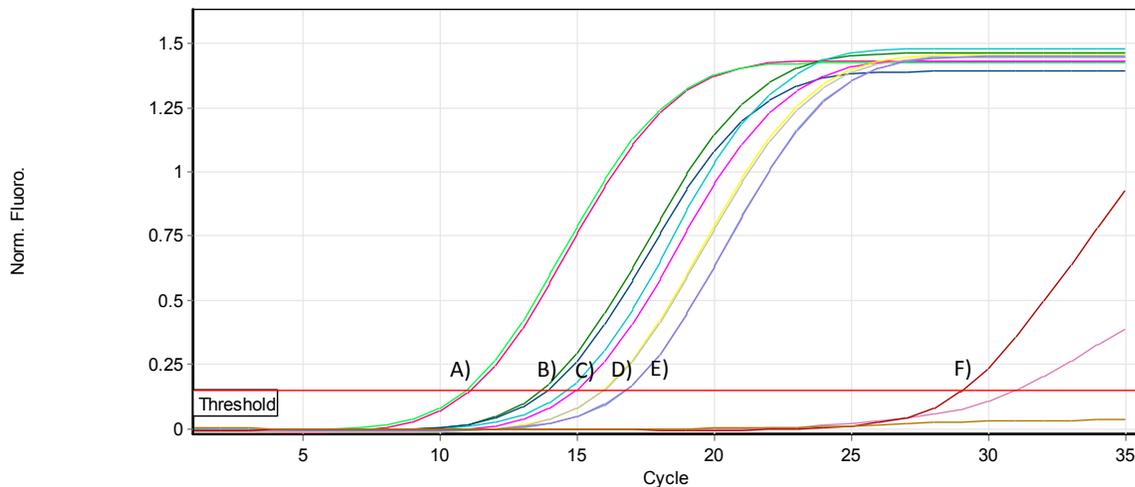
**Fig. 27.** Grafico resultante de la reacción de tiempo real bajo las condiciones de amplificación descritas en la metodología, la gráfica muestra la señal de fluorescencia contra los ciclos de amplificación de DNA extraído de las células transducidas con los volúmenes de sobrenadante **A)** 2000 **B)** 1000 **C)** 500 **D)** 100 **E)** Control negativo.



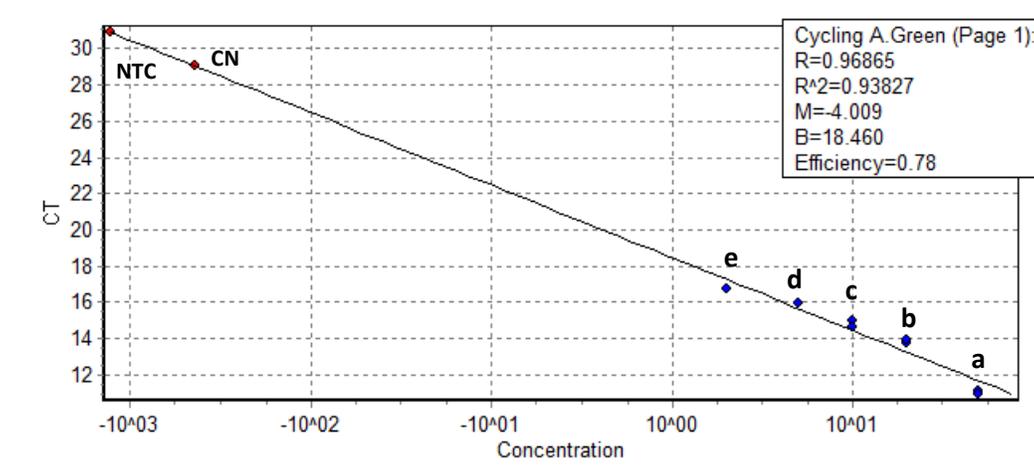
**Fig. 28.** Grafica generada a partir del análisis de amplificación, con el software del Rotor Gene 6000, los puntos en azul representan la concentración (número de copias) en los determinados Ct: a) 100 b) 500 c) 1000 d) 2000, valores de ct de control negativo y NTC (no template control).

## TITULACION POR TIEMPO REAL: RNA

La titulación por medio de tiempo real del RNA del vector lentiviral fue realizada con el concentrado, utilizando el virus producido en simultáneo con los que se realizó en análisis FACS de la figura 24 y se extrajo RNA total con QIAGEN RNeasy Midi/Maxi kit siguiendo los pasos descritos en el anexo de los siguientes volúmenes 2, 5, 10, 20, 50, 100  $\mu\text{l}$ .



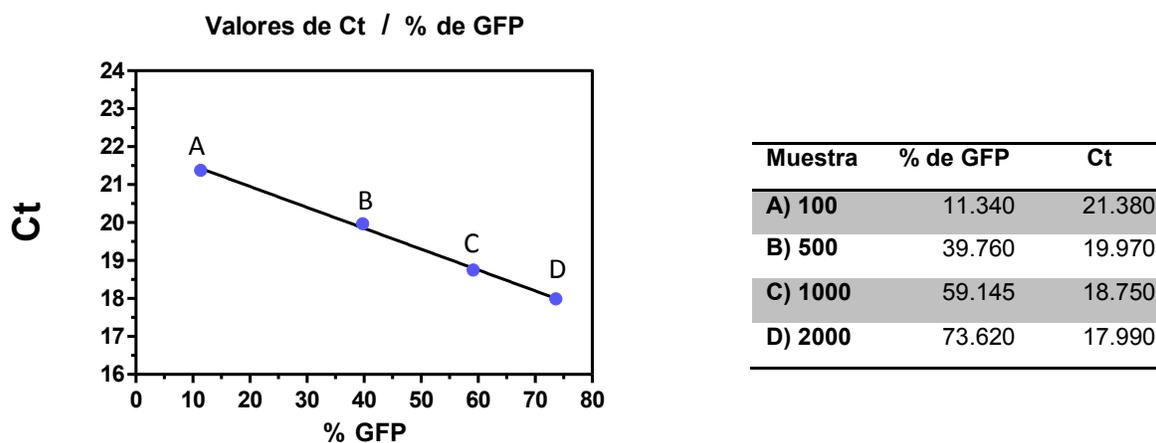
**Fig. 29. Grafico resultante de la reacción de tiempo real bajo las condiciones de amplificación descritas en la metodología,** la gráfica muestra la señal de fluorescencia contra los ciclos de amplificación de DNA extraído de las células transducidas con los volúmenes de concentrado **A) 50 $\mu\text{l}$  B) 20 $\mu\text{l}$  C) 10 $\mu\text{l}$  D) 5 $\mu\text{l}$  E) 2  $\mu\text{l}$  F) Control negativo.**



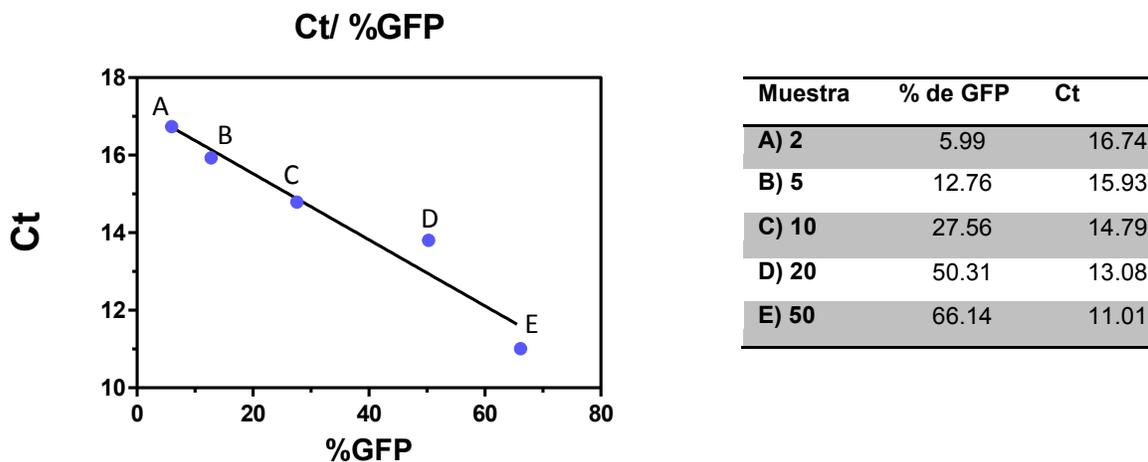
**Fig. 30 Grafica generada a partir del análisis de amplificación,** con el software del Rotor Gene 6000, los puntos en azul representan la concentración (número de copias) en los determinados CT: **a) 50 b) 20 c) 10 d) 5 e) 2** valores de ct de control negativo (**CN**) y **NTC** (no template control).

## CURVAS DE TITULACIÓN

Una vez realizadas las titulaciones por citometría y tiempo real y evaluando que los datos mostraran coherencia, es decir que conforme aumentara el volumen de sobrenadante utilizado de la misma manera lo hiciera la señal de GFP, o bien que a medida que aumentara el volumen de sobrenadante de la misma manera el DNA amplificara en un ciclo menor, se realizaron las curvas de titulación del reportero:



**Fig. 31. Curva de titulación.** Grafico que muestra la correspondencia entre la señal de GFP y el Ct de la reacción de amplificación por tiempo real del DNA genómico de las DPSC transducidas con el sobrenadante del vector, los valores del porcentaje de fluorescencia son de la producción simultanea de fig.26



**Fig. 32. Curva de titulación.** Grafico que muestra la correspondencia entre la señal de GFP y el Ct de la reacción de amplificación por tiempo real del RNA extraído del concentrado del vector producido en simultaneo con la producción de la fig. 26

## 4. DISCUSIÓN

---

Los vectores lentivirales son una importante herramienta de transferencia de material genético para ensayos de diversos tipos, siendo la transgénesis una de sus principales aplicaciones. El uso de vectores lentivirales es a la fecha uno de los métodos estándar para la transducción de genes, debido a su bajo costo y a su capacidad para infectar a una gran cantidad de células en diferentes fases del ciclo celular, y facilidad de integrarse al genoma del hospedador. Cuando se trabaja con partículas lentivirales es imperativo contar con al menos una metodología adecuada para llevar a cabo la titulación, ya que no solo permite conocer la calidad del virus en producción, sino que además permite tener un mayor control de los ensayos realizados.

### **ESTANDARIZACIÓN PARA ENSAYOS DE CITOMETRÍA: DETERMINACIÓN DEL USO DE SOBRENADANTE Y CONCENTRADO**

La estandarización para ensayos de citometría se llevó a cabo con el propósito de evaluar la eficiencia del uso de sobrenadante y concentrado.

Para utilizar el concentrado se utilizaron diferentes proporciones del sobrenadante con respecto del medio de cultivo, después de 24 horas de haber entrado en contacto con el vector se realizó la adquisición. Se realizaron dos replicas para este ensayo, las imágenes mostradas en los incisos **A, B, C, D** y **F** de la **Figura 15** junto con fotografías de las DPSC en contraste de fase corresponden a una sola de las réplicas realizadas, los datos de ambas replicas son mostrados en el **Cuadro 8**. Como es posible observar el inciso **A** correspondiente a la dilución 1:1 (500/500 volumen en  $\mu\text{l}$ ) existe una señal de fluorescencia de 93.02% hecho que implica una alta eficiencia y estabilidad del vector, de acuerdo a los reportes realizados en trabajos de titulación similares (**Sastry et. al,2002, Geraerts et.al, 2006**) esta señal se considera alta, no es comúnmente alcanzada, ya que la eficiencia de transducción de los vectores lentivirales, evaluada por FACS usualmente oscila entre el 70 y 80% (como este mismo trabajo muestra); sin embargo y como se discute más adelante, la señal alta podría estar relacionada

con la saturación del umbral de detección de GFP por el citómetro. La **Figura 16** muestra el comportamiento de las diluciones del vector empleadas, en donde es clara la tendencia a la saturación al disminuir los intervalos numéricos entre los tres últimos puntos correspondientes a las diluciones 1:1, 1:2, 1:3.

Posteriormente se llevó a cabo una nueva producción viral con el propósito de evaluar la capacidad de transducción de un concentrado de los sobrenadantes colectados durante 3 días cada cosecha realizada después de 12 horas como está indicado en el protocolo 0, en el **cuadro 2**. En la **figura 17** los incisos **A, B, C, D** y **E** corresponden al análisis realizado con Cyflogic después de la adquisición con FACS 24 horas después de que las DPSC entraron en contacto con los volúmenes seriados del concentrado del vector 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 y 16  $\mu$ l junto con las respectivas fotografías en contraste de fases. El juego de imágenes correspondiente al inciso **A**, volumen 2  $\mu$ l del concentrado muestra una señal de fluorescencia de 27.4%, esta señal es elevada si se toma en consideración que se trata del volumen más bajo empleado para la transducción. En el conjunto de imágenes de la **figura 18** con los incisos **A** y **B** se encuentran los porcentajes de fluorescencia para las transducciones con los volúmenes de concentrado 14 $\mu$ l y 16 $\mu$ l tras su posterior análisis con Cyflogic en el gráfico incluido es posible observar como el aumento en la señal al incrementar el volumen se detiene, este hecho confirma el comportamiento de saturación que posee una transducción con el vector y provee evidencias adicionales a la idea de que existe un umbral de detección de fluorescencia de GFP.

Para el presente estudio se realizó, en principio la estandarización de la producción de vectores lentivirales. Mediante diferentes recursos bibliográficos y empíricos fueron determinadas las condiciones óptimas para la generación de vectores con un título alto. Las estandarizaciones se realizaron a partir del protocolo 0, únicamente para el protocolo de lípidos catiónicos (ver metodología) y haciendo modificaciones al mismo, para regularizar de manera eficiente las variables encontradas durante este proceso, el cual comienza desde la selección y mantenimiento de los materiales a utilizar:

Respecto a las células 293-T deben tener un 70% de confluencia, al momento de la transfección, de ser sobrepasada esta confluencia se presenta un efecto conocido como inhibición por contacto, este fenómeno es característico de esta línea celular, se presenta como un arresto celular, en donde la proliferación y el crecimiento de las células se ven afectados por el contacto de una célula con una célula contigua (**Seluanov et al., 2009**).

El cuidado de las células 293-T durante la producción lentiviral debe ser estricto y meticuloso. Se ha reportado, que durante el proceso de generación de partículas lentivirales la acidificación del pH puede intervenir en la pérdida de infectividad de la membrana derivada de VSV-G del lentivirus, específicamente la proteína G del VSV tiene una capacidad reversible, esto es que una vez que las partículas se han inactivado al descender el pH a un valor menor a 6, la actividad de la membrana puede ser reactivada al regular el pH fisiológico (**C.Harrison, 2008**)

Respecto a la adición de BFS al medio de cultivo para las células 293 T, la falta del mismo puede generar una proliferación por debajo del 70% necesario para la transfección, sin embargo un exceso del mismo puede elevar el pH, causando también inhibición por contacto (**Ceccarini & Eagle, 1971**). Por tanto se determinó que la cantidad utilizada no debe superar los parámetros arriba descritos, se encontró que cultivar las 293-T al 5% de BFS funcionaba adecuadamente para la proliferación sin elevar el pH del cultivo.

Uno de los primeros planteamientos que surgen durante la elaboración de vectores lentivirales, es sobre el uso del sobrenadante y del concentrado, para conseguir un alto título viral resulta indistinto utilizar cualquiera de los dos métodos, específicamente para los ensayos de titulación, el uso del concentrado permitirá utilizar menor volumen, lo que permitirá tener cultivos de células blanco con la cantidad de medio necesaria para su óptimo crecimiento en cultivo. Como se muestra en las figuras **17** y **18**, si son comparados los valores resultantes del análisis de la adquisición por FACS se puede observar que en ambos casos fue posible alcanzar un alto título que oscila entre el 80% y el 90% mediante cualquiera de las dos formas de transducción existente, sin embargo cabe mencionar que en ambos casos hay pasos clave para lograr una óptima

producción de vectores, ya sea concentrando el virus o utilizando el sobrenadante:

**a)** En el caso del sobrenadante, es importante evaluar la fluorescencia de cada una de las cosechas, para determinar cuál es la que se va a utilizar. No es recomendable utilizar el sobrenadante de las tres cosechas para realizar la transducción, ya que se termina por diluir la cosecha con más capacidad de transducción. De ser posible se debe evaluar la capacidad de cada una de las cosechas diariamente, mediante infecciones rápidas de 24 horas, sobre una cantidad conocida de células, de esta manera mientras se va cosechando es posible ir evaluando la capacidad de transducción y delimitar cuál de las 3 cosechas es la más viable, o bien se decide concentrarlas. En caso de no ser posible hacer infecciones rápidas, evaluar la fluorescencia diaria al microscopio bajo la luz ultravioleta será la única manera de comprobar la capacidad de la señal. No es recomendable utilizar sobrenadantes de más de una tercera cosecha, ya que existe una mayor probabilidad que las células se encuentren ahora bajo un estrés mayor al aumentar el pH, lo que en principio está asociado a la inactivación del virus.

**b)** El caso de concentrado es similar al del sobrenadante: debe evaluarse mediante infecciones rápidas la capacidad de cada cosecha, para decidir cuáles serán utilizadas para concentrar. En este caso es posible concentrar cosechas pasadas del tercer día. Una vez que se ha decidido concentrar, es importante previamente haber probado y estandarizado un protocolo de concentración mediante ultra-centrifugación, sólo esta puede concentrar las partículas lentivirales sin comprometer su estabilidad. Es de vital importancia que la ultra-centrifugación se lleva cabo al menos una vez antes de realizar la transducción, algunos autores realizan este proceso más de una vez (**Nair, 2008**).

## **CARACTERIZACIÓN DEL PLÁSMIDO**

Los pasos que llevan a la producción del vector lentiviral comienzan con la purificación del sistema de plásmidos pMD2.G y psPAX2, así como de los plásmidos transfer e-GFP y OKSIM. Si bien la purificación es un proceso simple, si

se realiza como en el caso del presente con MAXI KIT, resulta de vital importancia la caracterización del mismo mediante un ensayo de restricción, siendo la razón principal la de tener la certeza de que en efecto, se ha purificado el plásmido deseado, pues siempre existe el riesgo de contaminación de los cultivos bacterianos destinados a la purificación. Adicionalmente en el presente, los plásmidos fueron caracterizados cada vez que se purificaba una nueva producción, sin importar si este pertenecía a una bacteria con la se trabajó constantemente, tal es el caso de psPAX2, pMD2.G y e-GFP.

### **LA CURVA ESTÁNDAR**

De acuerdo con los resultados de la **figura 20**, la elaboración de una curva estándar resulta un método práctico para el cálculo mediante la obtención del Ct el número de copias presentes en una muestra no sólo de diluciones seriadas de un plásmido, sino también, por ejemplo en el caso de la titulación por DNA es posible estimar conociendo los valores de Ct la cantidad de integraciones (número de copias) presentes en una producción viral.

### **PROTOCOLOS**

Si bien el SFB, provee nutrientes, necesarios para el mantenimiento de las células en cultivo, durante los ensayos de producción del vector, al realizar la transfección de acuerdo al protocolo 0 (ver materiales y métodos) en repetidas ocasiones el virus disminuía o perdía su capacidad infectiva al cambio de medio, es decir, después de 24 horas de haber realizado la transfección, al reemplazar el medio preparado con FBS al 5% y recolectarlo 12 horas después, se observó una pérdida de infectividad de este sobrenadante que contenía suero, es por esta razón que se generaron los protocolos 1,2 y 3 (ver materiales y métodos) ya que resulta evidente que el suero tenía un posible efecto sobre el virus, existe la posibilidad de activación del complemento contenido en el suero, por acción del plásmido (material genético externo). Debido a que el suero es un producto de la sangre contiene elementos del complemento, que pueden llevar a una lisis celular mediada por el complemento. Por este motivo se aconseja de la misma manera

inactivar el suero por medio de calor (90°C por 30 minutos).Adicionalmente, se recomienda el uso de un medio reducido en suero como OPTIMEM ya que es importante mantener los nutrientes durante y después de la transducción, ya que mientras las células permanezcan vivas podrán producir partículas virales (**Rahman et al.,2011**).

Como está representado en el esquema de la figura 11, el ensayo de citometría-FACS era realizado como primera opción de titulación, lo que implicaba que el concentrado/sobrenadante era usado instantáneamente para realizar la adquisición 24 horas después, para posteriormente realizar la titulación por medio de PCR-Tiempo Real con DNA, los análisis, mostrados en la **figura 22**, muestran un título regular (entre el 59 y el 69% ) comprobando que en efecto, existe GFP funcional expresándose por medio del transgen, el cultivo adicional destinado a la titulación por tiempo real de DPSC, infectadas en simultaneo, o 24 horas después de producido el vector, presentaba menor fluorescence o bien no presentaba fluorescence alguna, haciendo difícil evaluar si existían integraciones por parte del transgen. Este fenómeno tiene dos posibles explicaciones, relacionadas con la estabilidad del vector lentiviral:

- a) Inactivación por el contacto del virus con el FBS del medio de cultivo de las DPSC, es por esta razón, además de disminuir la diferenciación, que es altamente recomendable el uso de un medio reducido en suero como OPTIMEM.
- b) Inactivación por la permanencia del vector dentro de la cámara de cultivo, pues se ha reportado que si el vector no es lo suficientemente estable este puede ser inactivado por la sola acción de las condiciones de cultivo.
- c) Inactivación por almacenamiento, debido a la rigurosidad de los tiempos de infección, en ocasiones el sobrenadante/concentrado debía ser almacenado para su uso a 4°C de 2 a 7 días, puesto que se había planeado utilizarlo para la titulación por tiempo real, en vez de almacenarse como describen con algunos autores a -70°C ya que la congelación y descongelación constante reduce de manera gradual el título viral, A pesar de estas medidas el vector también resultaba inactivado. (**W.Bocker et al. 2007, Tzicornia , Singer & Verma, 2006, Zufferey et al. 1997** ) .

## **ANÁLISIS DE CITOMETRÍA**

Un hecho que llama la atención acerca del comportamiento de las curvas generadas a partir de los porcentajes de fluorescencia de las adquisiciones por citometría es sin duda la regularidad de los protocolos implementados, estos mantienen similitudes en el porcentaje de células que pueden infectar sin importar la cantidad de células presentes en el cultivo. Por otro lado, destaca la correspondencia de las gráficas elaboradas a partir de la adquisición, todas tienen un ajuste adecuado con la función de curva de saturación, al ser realizado el ajuste automático con el software GraphPad Prism 5. Este hecho puede ser comprobado al observar el inciso **A** de la figura **26**, en donde el comportamiento de la gráfica corresponde perfectamente con el comportamiento sugerido. Esta información implica que existe un umbral en donde la fluorescencia de las muestras no puede aumentar y no debido a la cantidad de volumen de virus agregado sino que el canal FL1 no puede medir más allá del 80% de señal. Lo cual resulta en una desventaja para esta técnica de titulación, pues el umbral está dado por la intensidad de la señal y no necesariamente por la cantidad de células infectadas.

## **LA TITULACION POR TIEMPO REAL**

Como ya se ha mencionado La cuantificación por tiempo real se conforma como una PCR estándar, sin embargo a la mezcla de reacción es agregado un fluoróforo (SYBR-green) para medir fluorescencia tras excitar el fluoróforo a la longitud de onda apropiada, es posible medir la tasa de generación del producto específico. Dicha medición, se realiza luego de cada ciclo de amplificación. Una vez obtenida la gráfica de amplificación los valores en X (número de ciclos) son denominados Ct. El Ct se define entonces como el número de ciclos requeridos para que la señal de fluorescencia cruce el umbral (de amplificación). Los niveles de Ct son inversamente proporcionales a la cantidad de ácido nucleico en una muestra, lo que significa que a mayor cantidad de ácido nucleico, mayor será la cantidad de fluoróforo excitado y menor el ciclo de amplificación necesario para el cruce del umbral.

## DNA

La titulación por tiempo real se realizó a partir de DNA extraído de DPSC transducidas con diferentes volúmenes seriados de sobrenadante de la segunda cosecha y se realizó la reacción de tiempo real de acuerdo a las condiciones del **cuadro 4** una vez realizada la reacción se obtuvieron las curvas de amplificación del gráfico en la **figura 27**. Una vez obtenida la gráfica se comprobó que la reacción se llevó a cabo de la forma esperada, evaluando que el ciclo de amplificación correspondiera a la cantidad de DNA integrado, esperando encontrar una relación inversamente proporcional entre el DNA extraído de las células transducidas y el ciclo de amplificación, las células transducidas con un volumen mayor de sobrenadante del vector, tendrán una cantidad mayor de integraciones y la reacción amplifica en un ciclo menor, como se observa en el gráfico de la **figura 27** el inciso **A** corresponde a DNA extraído de las DPSC que fueron transducidas con un cantidad mayor de sobrenadante 2000µl que comienza a amplificar antes del ciclo 20, lo que corresponde a un Ct de 18. Del mismo modo el inciso **D** correspondiente al DNA extraído de células expuestas al menor volumen de sobrenadante 500 µl comienza a amplificar de manera esperada en un ciclo mayor 25 lo que corresponde a un Ct de 20.01, ambos valores junto con los valores intermedios fueron graficados utilizando el software del equipo donde se realizó la reacción de tiempo real: Rotor gene 6000 series software, utilizando los valores de Ct para generar una gráfica que permitiera estimar el número de copias presentes en cada muestra, como puede observarse el inciso **d** corresponde a la muestra de DNA transducida con el volumen de sobrenadante de 2000 µl que representa la mayor cantidad de copias (DNA integrado).

## RNA

La titulación por tiempo real de RNA se llevó a cabo utilizando el vector concentrado de 3 cosechas utilizando volúmenes de concentrado (2, 5, 10, 20, 50 µl) producidos de manera simultánea a los utilizados para transducir DPSC para su posterior adquisición con FACS son mostrados en la **figura 26** inciso **B** y de acuerdo a las condiciones del **cuadro 5**. En la figura 29 la muestra marcada con el inciso **A** corresponde al RNA extraído directamente del volumen mayor de

concentrado utilizado (50  $\mu$ l) que comienza a amplificar en el ciclo 10 con un valor de Ct de 11.01 de la misma manera en la misma figura el inciso **E** correspondiente al volumen de concentrado de 2  $\mu$ l con un ciclo de amplificación alrededor de 15 con un valor de Ct de 16.74 ambos valores muestran un comportamiento esperado en donde la mayor cantidad de ácido nucleico (RNA) corresponde a un Ct mayor, ambos valores junto con los valores intermedios fueron graficados utilizando el software Rotor gene 6000 series software, utilizando los valores de Ct para generar una gráfica que permitiera estimar el número de copias presentes en cada muestra, como puede observarse que el inciso **a** corresponde a la muestra de RNA extraído directamente de 50  $\mu$ l de concentrado que representa la mayor cantidad de copias que en el caso del RNA se trata del número de posibles integraciones presentes en el concentrado.

### **CURVAS DE TITULACIÓN**

Las curvas de titulación se generan a partir de las representaciones graficas valores de Ct de la amplificación por tiempo real y los porcentajes de fluorescencia obtenidos mediante FACS de diferentes volúmenes de concentrado/sobrenadante con el propósito de evaluar la correspondencia entre ambos valores y de esta manera poder estimar señal de fluorescencia para un volumen específico del vector, la cantidad de copias (DNA) integradas en el genoma de la célula blanco o bien la cantidad de posibles integraciones (RNA) presentes en cierta cantidad de volumen del vector, esto último resulta de utilidad cuando el vector producido en simultáneo con el reportero de GFP no cuenta con su propio reportero de expresión integrado, o bien el vector de interés cuenta con un reportero de expresión pero no se cuenta con un citómetro adecuado para la cuantificación de la señal del reportero.

En la **figura 31** se muestra la relación lineal inversamente proporcional entre el Ct de la amplificación y la señal de fluorescencia, como anteriormente se ha descrito el mayor volumen de sobrenadante debe corresponder a una señal más alta de fluorescencia y a un valor menor de Ct hecho que es comprobado si se observa el inciso **D** correspondiente al volumen de sobrenadante 2000  $\mu$ l este tiene una señal

de fluorescencia 73.620% y un valor de Ct de 17.990 o bien el inciso A en donde corresponden el mayor ciclo de amplificación 21.380 con el menor volumen 100  $\mu$ l y la menor señal de fluorescencia 11.34%. Cabe mencionar que la gráfica confirma la hipótesis acerca de la relación lineal inversamente proporcional entre el porcentaje de fluorescencia y el Ct de amplificación a la vez que cumple la función de curva de titulación en donde es posible interpolar valores deseados para obtener estimados de los parámetros arriba mencionados.

En el caso de la **figura 32** si bien la curva de titulación tiene un comportamiento lineal y obedece la proporcionalidad inversa entre la señal de fluorescencia, existen dos puntos que quedan fuera de la recta de la función con la que se ha linearizado la gráfica, los incisos **D** y **E** correspondientes al RNA de los volúmenes 20 y 50  $\mu$ l con valores de Ct de 13.08 y 11.01 respectivamente, con las señales más altas de fluorescencia de la recta, el origen de esta variación puede deberse al hecho de que se está trabajando con RNA, pues es bien conocida su labilidad, la degradación del RNA puede estar dada por una serie de variables durante el proceso de extracción o bien degradación durante la reacción de tiempo real. Otra opción para esta variación en la recta puede deberse a que durante el proceso de transfección no todo el plásmido agregado haya podido viajar al núcleo y se haya conservado dentro del medio y haya permanecido durante la recolección de las cosechas, concentrado e introducido a la reacción de tiempo real contaminando las muestras y ocasionando la presencia de cuantificaciones poco certeras. Adicionalmente sin importar la cantidad de RNA presente en los concentrados, se sabe que del RNA viral que posiblemente puede llegar al núcleo de la célula y ser retrotranscrito no todo el RNA presente logrará llegar. La titulación con RNA obedece las correspondencias para la titulación del vector, sin embargo existen variables a considerar si se espera obtener una cuantificación certera.

Las recomendaciones metodológicas que aporta el presente trabajo están relacionadas con la dificultad de trabajar con el vector, pues se trata de partículas altamente sensibles a cualquier tipo de cambio en relación a las condiciones de cultivo y transfección.

Las opciones actuales de titulación lentiviral incluyen la medición de RNA del sobrenadante/concentrado del vector (titulación por RNA) medición del DNA del vector en células transducidas y la expresión de un transgen después de realizada la transducción. La medición del título en el sobrenadante/concentrado es técnicamente el método más sencillo y provee rápidamente datos acerca de la concentración del vector. Desafortunadamente la titulación con RNA podría no reflejar el título funcional debido a la presencia de partículas interferentes, inhibidores de la transducción, y DNA plasmídico de la producción viral. Por otro lado la expresión de un transgén reportero como GFP en células transducidas es un método simple y puede estimar el título funcional, sin embargo las limitaciones de este método se presentan cuando se asume que el nivel de expresión del vector está por encima del umbral de detección además que no permite distinguir a las células con múltiples copias del vector. El método de titulación, más riguroso y también el más laborioso es la medición del DNA del concentrado/sobrenadante. La desventaja que proveen estos métodos de titulación es la gran variabilidad que muestra cada transfección, incluso con un protocolo, estable y de alto título como los sugeridos aquí.

## 5. CONCLUSIONES

---

Es de vital importancia siempre trabajar con un vector reportero de expresión, ya que estos no solo resultan útiles para evaluar la calidad de la producción viral sino que pueden ser utilizados para titular mediante producciones simultáneas del reportero, otros vectores; por ejemplo el vector utilizado para la reprogramación de células humanas OKSIM, entre otros utilizados en el laboratorio donde se elaboró el presente proyecto. GFP es un reportero de expresión de gran utilidad, sobre el cual pueden ser aplicadas metodologías de titulación, simples en principio y de bajo costo.

Existen limitantes para la titulación de GFP con ensayos por FACS, ya que una alta señal, puede generar un umbral en donde la señal de GFP no incrementa a pesar de aumentar la cantidad de sobrenadante/concentrado utilizado para transducir DPSC. Es recomendable utilizar esta técnica de titulación (FACS), siempre en simultáneo con una técnica que evalúe no solo a nivel de expresión, donde sea posible cuantificar la cantidad integraciones del genoma de las células blanco, o de posibles integraciones en las células blanco.

Una de las técnicas más accesibles para titular un vector lentiviral, es la PCR-Tiempo Real, la cual permite evaluar el Ct y el número de copias de DNA o posibles copias en el caso de la titulación con RNA, presentes en diferentes volúmenes del sobrenadante/ concentrado, de esta manera es posible generar una curva de titulación que resulta útil para realizar ensayos con otros vectores, que no posean un reportero de expresión de señal cuantificable. La desventaja que tiene la titulación por esta técnica, es la incertidumbre que provee, pues resultados no mostrados, indican la presencia de integraciones no funcionales, partículas con más de una integración y muestras amplificadas en falso debido a contaminación con plásmido. En el caso de la titulación por RNA, esta puede arrojar sobrevalores de las copias presentes, ya que no todas las copias de RNA se integraran para producir proteína funcional.

## 6. ANEXO

---

### TÉCNICAS Y PROTOCOLOS INCLUIDOS EN LOS MANUALES DE LOS KITS UTILIZADOS.

Las técnicas y protocolos aquí incluidos no forman parte de las metodologías implementadas en el presente trabajo, se trata únicamente de técnicas que incluyen los manuales de los kits utilizados, que no afectan significativamente la reproducibilidad del mismo y por tanto pueden ser reemplazadas o implementadas alternativas a las presentadas aquí. En caso de existir alguna modificación a estos protocolos esta se encuentra mencionada en la parte de metodología.

### PROTOCOL: PLASMID OR COSMID DNA PURIFICATION USING QIAGEN™ PLASMID MAXI KITS

This protocol is designed for preparation of up to 100 µg of high- or low-copy plasmid or cosmid DNA using the QIAGEN Plasmid Midi Kit, or up to 500 µg using the QIAGEN Plasmid Maxi Kit. For additional protocols, such as for purification of very low-copy plasmids or cosmids of less than 10 copies per cell, see page 29 or visit [www.qiagen.com/goto/plasmidinfo](http://www.qiagen.com/goto/plasmidinfo). Low-copy plasmids that have been amplified in the presence of chloramphenicol should be treated as high-copy plasmids when choosing the appropriate culture volume.

**3. Harvest the bacterial cells by centrifugation at 6000 x g for 15 min at 4°C.** If you wish to stop the protocol and continue later, freeze the cell pellets at –20°C.

**4. Resuspend the bacterial pellet in • 10 ml Buffer P1.** For efficient lysis it is important to use a vessel that is large enough to allow complete mixing of the lysis buffers. Ensure that RNase A has been added to Buffer P1. If LyseBlue reagent has been added to Buffer P1, vigorously shake the buffer bottle before use to ensure LyseBlue particles are completely resuspended. The bacteria should be resuspended completely by vortexing or pipetting up and down until no cell clumps remain.

**5. Add • 10 ml Buffer P2, mix thoroughly by vigorously inverting the sealed tube 4–6 times, and incubate at room temperature (15–25°C) for 5 min.** Do not vortex, as this will result in shearing of genomic DNA. The lysate should appear viscous. Do not allow the lysis reaction to proceed for more than 5 min. After use, the bottle containing Buffer P2 should be closed immediately to avoid acidification from CO<sub>2</sub> in the air. If LyseBlue has been added to Buffer P1 the cell suspension will turn blue after addition of Buffer P2. Mixing should result in a homogeneously colored suspension. If the suspension contains localized colorless regions or if brownish cell clumps are still visible, continue mixing the solution until a homogeneously colored suspension is achieved.

**6. Add or • 10 ml of chilled Buffer P3, mix immediately and thoroughly by vigorously inverting 4–6 times, and incubate on ice for • 20 min.** Precipitation is enhanced by using chilled Buffer P3 and incubating on ice. After addition of Buffer P3, a fluffy white material forms and the lysate becomes less viscous. The precipitated material contains genomic DNA, proteins, cell debris, and KDS. The lysate should be mixed thoroughly to ensure even potassium dodecyl sulfate precipitation. If the mixture still appears viscous, more mixing is required to completely neutralize the solution. If LyseBlue reagent has been used, the suspension should be mixed until all trace of blue has gone and the suspension is colorless. A homogeneous colorless suspension indicates that the SDS has been effectively precipitated.

**7. Centrifuge at  $\geq 20,000 \times g$  for 30 min at 4°C. Remove supernatant containing plasmid DNA promptly.**

Before loading the centrifuge, the sample should be mixed again. Centrifugation should be performed in non-glass tubes (e.g., polypropylene). After centrifugation the supernatant should be clear. **Note:** Instead of centrifugation steps 7 and 8, the lysate can be efficiently cleared by filtration using a QIAfilter Kits or Cartridges.

**8. Centrifuge the supernatant again at  $\geq 20,000 \times g$  for 15 min at 4°C. Remove supernatant containing plasmid DNA promptly.** This second centrifugation step should be carried out to avoid applying suspended or particulate material to the QIAGEN-tip. Suspended material (causing the sample to appear turbid) can clog the QIAGEN-tip and reduce or eliminate gravity flow. • 120  $\mu$ l sample from the cleared lysate supernatant and save for an analytical gel (sample 1) in order to determine whether growth and lysis conditions were optimal.

**9. Equilibrate a • QIAGEN-tip 500 by applying • 10 ml Buffer QBT, and allow the column to empty by gravity flow.**

Flow of buffer will begin automatically by reduction in surface tension due to the presence of detergent in the equilibration buffer. Allow the QIAGEN-tip to drain completely. QIAGEN-tips can be left unattended, since the flow of buffer will stop when the meniscus reaches the upper frit in the column.

**10. Apply the supernatant from step 8 to the QIAGEN-tip and allow it to enter the resin by gravity flow.** The supernatant should be loaded onto the QIAGEN-tip promptly. If it is left too long and becomes cloudy due to further precipitation of protein, it must be centrifuged again or filtered before loading to prevent clogging of the QIAGEN-tip. Remove a • 120  $\mu$ l sample from the flow-through and save for an analytical gel (sample 2) in order to determine the efficiency of DNA binding to the QIAGEN Resin.

**11. Wash the QIAGEN-tip with • 2 x 30 ml Buffer QC.** Allow Buffer QC to move through the QIAGEN-tip by gravity flow. The first wash is sufficient to remove all contaminants in the majority of plasmid DNA preparations. The second wash is especially necessary when large culture volumes or bacterial strains producing large amounts of carbohydrates are used. • 240  $\mu$ l sample from the combined wash fractions and save for an analytical gel (sample 3).

**12. Elute DNA with or • 15 ml Buffer QF.**

Collect the eluate in a 15 ml or 50 ml tube (not supplied). Use of polycarbonate centrifuge tubes is not recommended as polycarbonate is not resistant to the alcohol used in subsequent steps. **Note:** For constructs larger than 45–50 kb, prewarming the elution buffer to 65°C may help to increase yield. Remove a • 60 µl sample of the eluate and save for an analytical gel (sample 4). If you wish to stop the protocol and continue later, store the eluate at 4°C. Storage periods longer than overnight are not recommended.

**13. Precipitate DNA by adding ▲ 3.5 ml or • 10.5 ml (0.7 volumes) room-temperature isopropanol to the eluted DNA. Mix and centrifuge immediately at ≥15,000 x g for 30 min at 4°C. Carefully decant the supernatant.** All solutions should be at room temperature in order to minimize salt precipitation, although centrifugation is carried out at 4°C to prevent overheating of the sample. Alternatively, disposable conical bottom centrifuge tubes can be used for centrifugation at 5000 x g for 60 min at 4°C. Isopropanol pellets have a glassy appearance and may be more difficult to see than the fluffy, salt containing pellets that result from ethanol precipitation. Marking the outside of the tube before centrifugation allows the pellet to be more easily located. Isopropanol pellets are also more loosely attached to the side of the tube, and care should be taken when removing the supernatant.

**14. Wash DNA pellet with • 5 ml of room-temperature 70% ethanol, and centrifuge at ≥15,000 x g for 10 min. Carefully decant the supernatant without disturbing the pellet.** Alternatively, disposable conical-bottom centrifuge tubes can be used for centrifugation at 5000 x g for 60 min at 4°C. The 70% ethanol removes precipitated salt and replaces isopropanol with the more volatile ethanol, making the DNA easier to redissolve.

**15. Air-dry the pellet for 5–10 min, and redissolve the DNA in a suitable volume of buffer (e.g., TE buffer, pH 8.0, or 10 mM Tris·Cl, pH 8.5).** Redissolve

the DNA pellet by rinsing the walls to recover the entire DNA, especially if glass tubes have been used. Pipetting the DNA up and down to promote resuspension may cause shearing and should be avoided. Overdrying the pellet will make the DNA difficult to redissolve. DNA dissolves best under slightly alkaline conditions; it does not easily dissolve in acidic buffers.

## **PROTOCOL: ZYMO FUNGAL/BACTERIAL DNA MINIPREP™**

### **CATALOG NO. D6206**

1. Add 50-100 mg (wet weight) fungal or bacterial cells that have been resuspended in up to 200 µl of water or isotonic buffer (e.g., PBS) or up to 50 mg of tissue to a ZR BashingBead™ Lysis Tube. Add 750 µl *Xpedition*™ Lysis/Stabilization Solution to the tube. Note: The *Xpedition*™ Lysis/Stabilization Solution can be added to the ZR BashingBead™ Lysis Tube ahead of time, prior to sample addition.
2. Secure in a bead beater fitted with a 2 ml tube holder assembly (e.g., *Xpedition*™ Sample Processor for processing at the site of sample collection) and process for a minimum of 30 seconds. Store/transport samples. Proceed to Step 3 when convenient.
3. Centrifuge the ZR BashingBead™ Lysis Tube in a microcentrifuge at 10,000 x *g* for 1 minute.
4. Transfer up to 400 µl supernatant to a Zymo-Spin™ IV Spin Filter (*orange top*) in a Collection Tube and centrifuge at 7,000 x *g* (~7,000 rpm) for 1 minute.
5. Add 1,200 µl of Fungal/Bacterial DNA Binding Buffer to the filtrate in the Collection Tube from Step 4.

6. Transfer 800 µl of the mixture from Step 5 to a Zymo-Spin™ IIC Column in a Collection Tube and centrifuge at 10,000 x *g* for 1 minute.
7. Discard the flow through from the Collection Tube and repeat Step 6.
8. Add 200 µl DNA Pre-Wash Buffer to the Zymo-Spin™ IIC Column in a new Collection Tube and centrifuge at 10,000 x *g* for 1 minute.
9. Add 500 µl Fungal/Bacterial DNA Wash Buffer to the Zymo-Spin™ IIC Column and centrifuge at 10,000 x *g* for 1 minute.
10. Transfer the Zymo-Spin™ IIC Column to a clean 1.5 ml microcentrifuge tube and add 100 µl (25 µl minimum) DNA Elution Buffer directly to the column matrix. Centrifuge at 10,000 x *g* for 30 seconds to elute the DNA.

## **QIAGEN™ RNEASY MIDI/MAXI PROTOCOL FOR ISOLATION OF TOTAL RNA FROM ANIMAL CELLS**

### **Disrupt cells by addition of Buffer RLT.**

**For pelleted cells, loosen the cell pellet thoroughly by flicking the tube. Add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 6), and proceed to step 3.**

**Note:** Incomplete loosening of the cell pellet may lead to inefficient lysis and reduced yields. Ensure that β-ME is added to Buffer RLT before use (see “Important notes before starting”).

**For direct lysis of cells grown in a monolayer, add the appropriate volume of Buffer RLT (see Table 6) to the cell-culture dish. Collect cell lysate with a rubber policeman. Pipet lysate into an RNase-free glass or polypropylene tube (not supplied), and proceed to step 3.**

If total sample is grown on several dishes, the volume of Buffer RLT must be divided proportionately.

**Note:** Ensure that  $\beta$ -ME is added to Buffer RLT before use (see “Important notes before starting”).

**RNeasy column Number of cells Buffer RLT (ml)**

Midi \_  $5 \times 10^6$  –  $3 \times 10^7$  2.0

Midi \_  $3 \times 10^7$  –  $5 \times 10^7$  2.0 (4.0)\*

Midi \_  $5 \times 10^7$  –  $1 \times 10^8$  4.0

\* If using the RNeasy Midi Kit to prepare RNA from cells containing more than 150  $\mu$ g of total RNA

per  $10^7$  cells, it may be necessary to use \_ 4.0 ml Buffer RLT for  $>3 \times 10^7$  cells.

† If using the RNeasy Maxi Kit to prepare RNA from cells containing more than 2 mg of total RNA per  $1 \times 10^8$  cells, it may be necessary to use \_ 15.0 ml Buffer RLT for  $>1.5 \times 10^8$  cells.

**3. Homogenize cells using a conventional rotor–stator homogenizer for at least 45 s at maximum speed until the sample is uniformly homogeneous. Alternatively, vortex the sample for 10 s, and pass the lysate at least 5–10 times through an 18–20-gauge needle fitted to an RNase-free syringe.**

**Note:** Incomplete homogenization will lead to significantly reduced yields and can cause clogging of the RNeasy column. Homogenization with rotor–stator homogenizers generally results in higher total RNA yields than with other homogenization methods.

**4. Add 1 volume ( \_ 2.0 ml or 4.0 ml; \_ 7.5 ml or 15.0 ml) of 70% ethanol to the homogenized lysate, and mix thoroughly by shaking vigorously. Do not centrifuge.**

If some lysate is lost during homogenization, adjust volume of ethanol accordingly.

**Note:** Visible precipitates may form after the addition of ethanol when preparing RNA from certain cell lines. Resuspend precipitates completely by vigorous

shaking, and proceed immediately to step 5. Insufficient resuspension of precipitates will cause DNA contamination and can lead to impure total RNA.

**5. Apply the sample, including any precipitate that may have formed, to an \_ RNeasy midi column or \_ RNeasy maxi column placed in a \_ 15 ml or \_ 50 ml centrifuge tube (supplied). Maximum loading volume is \_ 4.0 ml or \_ 15 ml. Close the tube gently, and centrifuge for 5 min at 3000–5000 x g. Discard the flow-through.\***

Reuse the centrifuge tube in step 6. If the maximum amount of starting material is used, it may be necessary to increase centrifugation time to 10 min to allow the lysate to completely pass through the column.

If the volume exceeds \_ 4.0 ml or \_ 15 ml, load aliquots successively onto the RNeasy column, and centrifuge as above. Discard the flow-through after each centrifugation step.

**6. Add \_ 4.0 ml or Buffer RW1 to the RNeasy column. Close the centrifuge tube gently, and centrifuge for 5 min at 3000–5000 x g to wash the column. Discard the flow-through.\*** Skip this step if performing the optional on-column DNase digestion (pages 91–92). Reuse the centrifuge tube in step 7.

**7. Add \_ 2.5 ml Buffer RPE to the RNeasy column. Close the centrifuge tube gently, and centrifuge for 2 min at 3000–5000 x g to wash the column. Discard the flow-through.**

Reuse the centrifuge tube in step 8. In the RNeasy midi procedure, the flow-through need not be discarded.

**8. Add another \_ 2.5 ml Buffer RPE to the RNeasy column. Close the centrifuge tube gently, and centrifuge for \_ 5 min or \_ 10 min at 3000–5000 x g to dry the RNeasy silica-gel membrane.**

It is important to dry the RNeasy membrane since residual ethanol may interfere with downstream reactions. This centrifugation ensures that no ethanol is carried over during elution.

**Note:** Following the centrifugation, remove the RNeasy column from the centrifuge tube carefully so the column does not contact the flow-through as this will result in carryover of ethanol.

**9. To elute, transfer the RNeasy column to a new \_ 15 ml collection tube (supplied). Pipet the appropriate volume of RNase-free water (see Table 7) directly onto the RNeasy silica-gel membrane. Close the tube gently. Let it stand for 1 min, and then centrifuge for 3 min at 3000–5000 x g.**

**Table 7. RNase-free water volumes for RNeasy Midi/Maxi elution**

RNeasy column	Expected total RNA yield	RNase-free water
---------------	--------------------------	------------------

Midi _ ≤150 µg	150 µl
----------------	--------

Midi _ 150 µg – 1 mg	250 µl
----------------------	--------

**10. Repeat the elution step (step 9) as described with a second volume of RNase-free water.** To obtain a higher total RNA concentration, this second elution step may be performed by using the first eluate (from step 9). The yield will be 15–30% less than the yield obtained using a second volume of RNase-free water, but the final concentration will be higher.

## **7. BIBLIOGRAFIA REFERENCIADA**

---

**Alberts, B., Johnson A., J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, & P. Walter.** (2002). *Molecular Biology of the Cell*, 4th edition New York: Garland Science.

**Bacchetti S, Graham F.** (1977). *Transfer of the gene for thymidine kinase to thymidine kinase-deficient human cells by purified herpes simplex viral DNA.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 74 no.4, pp.1590-4.

**Barry S. C., Harder B., Brzezinski M., Lisa Y. Flint, Jurgen Seppen, and William R.A. Osborne.** (2001). *Lentivirus Vectors Encoding Both Central Polypurine Tract and Posttranscriptional Regulatory Element Provide Enhanced Transduction and Transgene Expression.* Human Gene Therapy. vol,12, pp. 1103–1108.

**Böcker W., Rossmann O., Docheva D., Malterer G., W. Mutschler , M. Schieker .**(2007). *Quantitative polymerase chain reaction as a reliable method to determine functional lentiviral titer after ex vivo gene transfer in human mesenchymal stem cells.*The Journal of Gene Medicine. Vol. 9, no. 7, pp. 585-95.

**Cartwright, P., McLean, C., Sheppard, A., Rivett, D., Jones, K., and Dalton, S.** (2005). *LIF/STAT3 controls ES cell self-renewal and pluripotency by a Myc-dependent mechanism.* Development. Vol.132, pp. 885–896.

**Ceccarini C, Eagle H.** (1971). *Induction and reversal of contact inhibition of growth by pH modification.* Nature New Biology. vol. 233, no. 43, pp. 271-3.

**Ceccarini C, Eagle H.** (1971). *pH as a Determinant of Cellular Growth and contact Inhibition*. Proceedings of the National Academy of Science. Vol. 68, no. 1, pp. 229-233.

**Coffin J, Hughes S, Varmus H. eds.** 1997. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Lab. Press.

**Cowan, C.A., Atienza, J., Melton, D.A., and Eggan, K.** (2005). *Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells*. Science. Vol. 309, pp.1369–1373.

**Dennis L. Haas, Scott S. Case, Gay M. Crooks, and Donald B. Kohn.** (2000). *critical Factors Influencing Stable Transduction of Human CD34+ Cells with HIV-1 Derived Lentiviral Vector*. Molecular Therapy Vol. 2, No.1.

**Dyana T. Saenz, Eric M. Poeschla.** (2004). *FIV: from lentivirus to lentivector* Journal of Gene Medicine. Vol. 6, pp.95-104.

**Evans, M.J., and Kaufman, M.H.** (1981). *Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos*. Nature. vol 292, pp. 154–156.

**Federico M.,** (2003) *From lentiviruses to lentivirus vectors* In. *Federico M (ed) Methods in Molecular Biology, Lentivirus Gene Engineering Protocols* edn. Humana Press Inc, Totowa, New Jersey. Vol. 229

**Follenzi A., Ailles L. E., Bakovic S., Geuna M. & Naldini L.** (2000). *Gene transfer by lentiviral vectors is limited by nuclear translocation and rescued by HIV-1 pol sequences*. Nature Genetics. vol. 25, pp. 212 – 222.

**Goff S., Berg P.** (1976). *Construction of hybrid viruses containing SV40 and  $\lambda$  lambda; phage DNA segments and their propagation in cultured monkey cells.* Cell. Vol. 9, no.4, pp. 695–705.

**Graham FL, van der Eb A.J.** (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. Vol. 52 no.2, pp. 456-67.

**Harrison S. C.** (2008) *viral membrane fusion.* Nature Structural & Molecular Biology. vol.15,pp.690–698.

**Jing Zhao & Andrew M. L. Lever.** (2007). *Lentivirus-Mediated Gene Expression.* Methods in Molecular Biology, vol. 366.

**Jonckheere H, Anné J, De Clercq E.** (2000). *The HIV-1 reverse transcription (RT) process as target for RT inhibitors.* Med Res Rev. vol. 20, no. 2, pp.129-54.

**Jonckheere H., J. Anné, E. De Clercq.** (2000). *The HIV-1 Reverse Transcription (RT) Process as Target for RT Inhibitors.* John Wiley & Sons, Inc. Medical Research Reviews, Vol. 20, No. 2, pp.129–154.

**Kingston R.E, Chen C.A, Rose J.K .** (2003). *Calcium phosphate transfection.* Current Protocols in Molecular Biology. capitulo 9, unidad 9.

**Lata R, Conway JF, Cheng N, Duda LR, Hendrix RW, Wikoff RW, Johnson EJ, Tsuruta H, Steven CA.** (2000). Maturation Dynamics of a viral Capsid. *Cell*. Vol. 100, no. 2, pp. 253-263.

**Mark A. Kay, Joseph C Glorioso & Luigi Naldini.**(2001). *Viral vectors for gene therapy: the art of turning infectious agents into vehicles of therapeutics.*Nature Medicine.Vol.7,pp. 40

**Miles L. R., Agresta B. E, Khan M. B., S. Tang ,J. G. Levin, & Powell M. D.** (2005). *Effect of Polypurine Tract (PPT) Mutations on Human Immunodeficiency Virus Type 1 Replication: a Virus with a Completely Randomized PPT Retains Low Infectivity.* Journal of Virology. vol. 79, no. 11, pp. 6859-6867.

**Nair A., Xie J., Joshi S., Harden P., Davies J., Hermiston T.** (2008). *A rapid and efficient branched DNA hybridization assay to titer lentiviral vectors.* Journal of Virological Methods. Volumen 153, no. 2, pp. 269–272

**Narayan O. & Clements J. E..** (1989). *Biology and Pathogenesis of Lentiviruses.* Journal of General Virology. vol. 70, pp. 1617-1639

**Nichols, J., Zevnik, B., Anastassiadis, K., Niwa, H., Klewe-Nebenius,D., Chambers, I., Scholer, H., and Smith, A.** (1998). *Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4.* Cell.vol. 95, pp. 379–391.

**Niwa, H., Yamamura, K., and Miyazaki, J.** (1991). *Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector.* Gene.vol.108, pp.193–199.

**O. Freed E.,** (1998). *Gag Proteins: Diverse Functions in the Virus Life Cycle HIV-1.* Virology. Vol. 251, pp.1–15

**P L Felgner, T R Gadek, M Holm, R Roman, H W Chan, M Wenz, J P Northrop, G M Ringold, and M Danielsen .** (1987). *Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 84, pp. 7413-7417.

**Panceraa M., Majeeda S., Banb Y.A, Chena L., Huanga C., Konga L.,Y. Do Kwona, J. Stuckeya, T. Zhoua, J. E. Robinsonc, W. R. Schiefb, J. S, Richard**

**Wyatta, and Peter D. Kwonga.** (2009). *Structure of HIV-1 gp120 with gp41-interactive region reveals layered envelope architecture and basis of conformational mobility*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Biochemistry. Vol. 107, no.3, pp.1166–1171.

**Pollard V. W.** (1998). *The HIV-1 Rev Protein*. Annual Reviews Microbiology. Vol. 52. pp. 491–532

**Rahman H., Qasim M., Schultze F.C., Oellerich M. & Asif A.R.** (2011). *Fetal calf serum heat inactivation and lipopolysaccharide contamination influence the human T lymphoblast proteome and phosphoproteome Proteome*. Science, Vol. 9, no. 71.

**Rahman, A. A., Teschner, M., Sethi, K. K. & Brandis, H.** (1976). *Appearance of IgG (Fc) receptor(s) on cultured human fibroblasts infected with human cytomegalovirus*. Journal of Immunology. Vol.117, pp .253–258.

**Robert Belshaw; Pereira V; Katzourakis A; Talbot G; Paces J; Burt A; Tristem M.** (2004). Long-term reinfection of the human genome by endogenous retroviruses. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.101, no. 14, pp. 4894–99.

**Royle, Bright & Lagnado,** (2004), *Clathrin is required for the function of the mitotic spindle*, Nature Vol. 434, pp. 1152-1157.

**Rubin H., Fanshier L., Cornelius A., Hughes W.F.** (1962). *Tolerance and immunity in chickens after congenital and contact infection with an avian leukosis virus*. Virology. Vol. 17, no. 1, pp. 143–156.

**Seluanov A., Hine C., Azpurua J., Feigenson M., Bozzella M., Mao Z., Catania K. C., & Gorbunova V.** (2009). *Hypersensitivity to contact inhibition provides a clue to cancer resistance of naked mole-rat*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. vol. 106, no. 46

**Seow Y., Wood M. J.** (2009). Biological Gene Delivery Vehicles: Beyond Viral Vectors. *Molecular Therapy*. vol. 17 no.5, pp. 767-777.

**Shaw G., Morse S., Ararat M. & Graham F. L.**, (2002). *Preferential transformation of human neuronal cells by human adenoviruses and the origin of HEK 293 cells*. *The FASEB Journal express article*. vol. 16, no. 8, pp. 869-871.

**Smillie C, Garcillán-Barcia M.P., Francia M.V., Rocha E.P., de la Cruz F.** (2010). *Mobility of plasmids*. *Microbiology Molecular Biology Reviews*. Vol.74, no. 3, pp. 434-52.

**Solomon J. M., Grossman D.** (1996), *Who's competent and when: regulation of natural genetic competence in bacteria*, Vol. 12, no. 4, pp. 150–155

**Sommer P., Vartanian J.P, Wachsmuth M., Michel Henry, Guetard D. & Simon Wain-Hobson.** (2004). *Anti-termination by SIV Tat Requires Flexibility of the Nascent TAR Structure*. *Journal of Molecular Biology*. Vol 22, pp. 2836

**Goff Stephen P.,** (2007). *Host factors exploited by retroviruses*. *Nature Reviews Microbiology*. vol.5, pp. 253–263

**Takahashi K. & Yamanaka S.** (2006). *Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors*. *Cell*. Vol.126, pp. 663–676.

**Tang H., Kuhen K.L., & Staal F.W.** (1999). *Lentivirus Replication and Regulation*. *Annual Review of Genetics*. vol. 33, pp. 133-170

**Thomson, J.A., Itskovitz-Eldor, J., Shapiro, S.S., Waknitz, M.A., Swiergiel, J.J., Marshall, V.S., and Jones, J.M.** (1998). *Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts*. *Science*. Vol. 282, pp. 1145–1147.

**Tiscornia G, Singer O, Verma IM.** (2006). *Production and purification of lentiviral vectors.* Nature Protocols. Vol. 1, no.1, pp. 241-5.

**D'Souza V., Melamed J., Habib D., Pullen K., Wallace K. & Summers M.F.** (2001). *Identification of a High Affinity Nucleocapsid Protein binding element within the Moloney Murine Leukemia Virus -RNA Packaging signal: Implications for Genome Recognition.* Journal of Molecular Biology. vol. 314, pp. 217-232.

**Wilmut, I., Schnieke, A.E., McWhir, J., Kind, A.J., & Campbell, K.H.**(1997). *Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells.* Nature. vol.385, pp. 810–813.

**Yu S F, Rüden T, Kantoff P., W., Garber C., Seiberg M., Rütter U, Anderson W. F., Wagner E. F., Gilboa E.**(1986). *Self-inactivating retroviral vectors designed for transfer of whole genes into mammalian cells (neomycin-resistance selection/c-fos/gene therapy).* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America Biochemistry. vol. 83, pp. 3194-3198.

**Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D.** (1998). *Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery.* Journal of Virology. Vol. 72 no.12, pp. 9873-80.

## 8. BIBLIOGRAFIA COMPLEMENTARIA

---

**Vigna E, Naldini L.** (2000). *Lentiviral vectors: excellent tools for experimental gene transfer and promising candidates for gene therapy*. *Journal Gene Medicine*, vol. 2, pp. 308–316.

**Naldini L, Verma IM.** (2000). *Lentiviral vectors*. *Advances in Virus Research*, vol.5, pp. 599–609.

**Buchsacher Jr. GL, Wong-Staal F.** (2000). *Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases*. *Blood*. Vol. 95 pp. 2499–2504.

**Murdoch B, Pereira DS, Wu X, Dick J.E, Ellis J.** (1997). *A rapid screening procedure for the identification of high-titer retrovirus packaging clones*. *Gene Therapy*, vol. 4, pp. 744–749.

**Sanburn N, Cornetta K.** (1999). *Rapid titer determination using quantitative real-time PCR*. *Gene Therapy*, vol 6, pp. 1340–1345.

**Tafuro S, Zentilin L, Falaschi A, Giacca M.** (1996) *Rapid retrovirus titration using competitive polymerase chain reaction*. *Gene Therapy* vol. 3, pp. 679–684.

**Cheng L, Fu J, Tsukamoto A, Hawley RG.** (1996). *Use of green fluorescent protein variants to monitor gene transfer and expression in mammalian cells*. *Nature Biotechnology*; vol. 14, pp. 606–609.

**Riviere I, Brose K, Mulligan RC.** (1995). *Effects of retroviral vector design on expression of human adenosine deaminase in murine bone marrow transplant recipients engrafted with genetically modified cells*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 92, pp. 6733–6737.

**Onodera M, Yachie A, Nelson DM, Welchlin H, Morgan RA, Blaese RM.** (1997) A simple and reliable method for screening retroviral producer clones without selectable markers. *Hum Gene Ther*; 8: 1189–1194

**Cashion L.M., Bare L.A., Harvey S., Trinh Q, Zhu Y., Devlin J.J.** (1999). *Use of enhanced green fluorescent protein to optimize and quantitate infection of target cells with recombinant retroviruses.* *Biotechniques*; **26**: 924–926.

**Naldini L., Blömer U., Gage F.H., Trono D., Verma I.M.** (1996) *Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol.**93**, pp. 11382–11388.

**Miller A.D.** 1990. *Retrovirus packaging cells.* *Human Gene Therapy*. Vol.2, pp. 5–14.

**Yamada K. et al.** 2001. *Functional correction of fanconi anemia group C hematopoietic cells by the use of a novel lentiviral vector.* *Molecular Therapy*, vol. 3, pp. 485–490.

**Naldini L., Blömer U., Gallay P, Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., Trono D.** (1996) *In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector.* *Science*, vol 272, pp. 263–267.

**Dull T., Zufferey R., Kelly M., Mandel R.J., Nguyen M., Trono D., Naldini L.** (1998) *A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system.* *Journal of Virology*, vol. 72, pp. 8463–8471.

**Kirkwood T.B., Bangham C.,R.** (1994). *Cycles, chaos, and evolution in virus cultures: a model of defective interfering particles.* *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Vol. 91, pp. 8685–8689.