



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**GENERACIÓN DE UN VECTOR LENTIVIRAL PARA LA
SOBREEXPRESIÓN DEL MICRORNA MIR-1270**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

HEIDI PAMELA HERNÁNDEZ MORALES



CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

AÑO 2022



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Marisol López López
VOCAL: Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova
SECRETARIO: Profesor: Eric Gustavo Ramírez Salazar
1er. SUPLENTE: Profesor: Rocío Gabriela Tirado Mendoza
2° SUPLENTE: Profesor: Alberto Ortega Vázquez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

INSTITUTO NACIONAL DE MEDICINA GENÓMICA-INMEGEN

ASESOR DEL TEMA:

DR. ERIC GUSTAVO RAMÍREZ SALAZAR

SUSTENTANTE:

HEIDI PAMELA HERNÁNDEZ MORALES

ÍNDICE GENERAL

1	Resumen	5
2	Antecedentes.....	7
2.1	Remodelado óseo	7
2.1.1	La osteoporosis	8
2.2	Los microRNAs	10
2.2.1	Biosíntesis y función de miRNAs	10
2.3	Osteoporosis y microRNAs	11
2.4	Familia <i>Retroviridae</i> : género lentivirus	13
2.4.1	Virus de la familia <i>Retroviridae</i> . Generalidades	13
2.5	Lentivirus.....	16
2.6	Estructura del virión de HIV-1	17
2.7	Estructura del genoma del HIV-1	18
2.8	Ciclo de replicación viral de HIV-1.....	21
2.8.1	Unión, fusión y liberación.....	21
2.8.2	Transcripción reversa	23
2.8.3	Integración.....	26
2.8.4	Transcripción del genoma proviral.....	28
2.8.5	Traducción de proteínas virales.....	28
2.8.6	Ensamblaje, gemación y maduración	29
2.9	Vectores virales.....	30
2.9.1	Vectores virales frecuentemente utilizados	30
2.9.2	Vectores lentivirales (VL): sistemas basados en HIV-1	32
2.9.3	Sistema de Vectores Lentivirales de Primera Generación.....	34
2.9.4	Sistema de Vectores Lentivirales de Segunda Generación	35
2.9.5	Sistema de Vectores Lentivirales de Tercera Generación basado en HIV-1.....	36
2.10	Producción de vectores lentivirales y líneas celulares de empaquetamiento	38
3	Justificación	40
4	Hipótesis.....	41
5	Objetivo general.....	41
5.1	Objetivos particulares.....	41
6	Diseño experimental	42

7	Materiales y métodos.....	43
7.1	Cultivo de la línea celular 293FT.....	43
7.2	Construcción del plásmido de transferencia pLentimiR-1270	44
7.2.1	Diseño y síntesis del oligo de doble cadena.....	44
7.2.2	Formación del pcDNAmiR-1270	46
7.2.3	Reacciones de recombinación BP/LR	47
7.2.4	Extracción y análisis de DNA plasmídico de las clonas de pLentimiR-1270	49
7.3	Plásmidos de empaquetamiento. Sistemas de segunda y tercera generación	50
7.4	Ensayos de restricción para la identificación de los plásmidos de empaquetamiento	53
7.5	Replicación de plásmidos en bacterias	54
7.6	Producción de vectores lentivirales.....	55
7.6.1	Co-transfección transitoria con plásmidos de segunda y tercera generación.....	56
7.6.2	Cosecha de vectores lentivirales	57
7.6.3	Infección de células 293FT	58
7.7	Concentración de las cosechas de vectores lentivirales por ultracentrifugación.....	58
7.8	Cálculo del título lentiviral.....	59
8	Resultados.....	59
8.1	Cultivo de la línea celular 293FT.....	59
8.2	Producción de vectores lentivirales (VL) en la línea celular de empaquetamiento 293FT.....	60
8.2.1	Obtención del pLentimiR-1270	60
8.2.2	Verificación de la presencia del gen reportero en el VT mediante transfección en células 293FT	64
8.2.3	Sistemas de vectores lentivirales de Segunda y Tercera Generación.	67
8.2.4	Protocolo de producción de vectores lentivirales (VL) en la línea celular de empaquetamiento 293FT: Co-transfección, cosecha e infección	
	70	
9	Discusión	86
10	Conclusiones.....	93
11	Perspectivas.....	94
12	Fuentes de consulta	94
13	ANEXOS	100

1 Resumen

El metabolismo óseo involucra principalmente a dos tipos celulares: los osteoclastos, encargados de la remoción de hueso viejo y los osteoblastos, encargados de la formación de masa ósea. Un desbalance en la actividad de estas células conlleva al desarrollo de la osteoporosis, enfermedad caracterizada por la pérdida de densidad mineral ósea y que se encuentra asociada a un alto riesgo de fracturas. En la actualidad, la creciente cifra de mujeres mexicanas postmenopáusicas osteoporóticas y la incidencia de fracturas debido a esta condición hacen de la osteoporosis un problema de salud grave. En la última década, se ha propuesto a los microRNAs como buenos candidatos para ser considerados como biomarcadores de diagnóstico, pronóstico y blancos terapéuticos en enfermedades metabólicas, como la osteoporosis.

Los microRNAs son moléculas de RNA no codificantes encargadas de regular la expresión genética principalmente a nivel postranscripcional impidiendo la traducción de los RNA mensajeros (mRNA) diana. La participación de los miRNAs se extiende a lo largo del organismo e incluye los procesos de regulación del metabolismo óseo.

Diferentes modelos animales y celulares han sido utilizados para el estudio del desarrollo de la osteoporosis y algunos microRNAs han sido propuestos como marcadores biológicos para el diagnóstico oportuno de esta enfermedad. Algunos monocitos circulantes, al ser precursores de osteoclastos, son utilizados como modelo de estudio de la osteoporosis; así mismo, estas células han demostrado tener expresión diferencial de algunos microRNAs en mujeres mexicanas postmenopáusicas osteoporóticas con respecto a mujeres mexicanas postmenopáusicas sanas. La dificultad particular que se atañe al empleo de monocitos circulantes (CMC) como modelo de estudio es el hecho de que son células no divisibles que no son fácilmente transfectadas por métodos convencionales.

Los virus del género *Lentivirus* (familia viral *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretroviridae*) son herramientas útiles en el diseño de vectores eficientes para la transferencia de genes tanto a células divisibles como no divisibles. Estos

vectores se generan introduciendo los genes necesarios para la formación de un lentivirus funcional, pero deficiente en el proceso de replicación, dentro de líneas celulares permisivas a la generación de partículas virales denominadas líneas celulares de empaquetamiento. Las células 293FT son las más empleadas para este fin.

Los vectores lentivirales han sido diseñados tomando como modelo el único miembro de la familia que infecta células humanas: el virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 (o HIV-1 por sus siglas en inglés); mediante la creación de sistemas que disminuyan el riesgo que conlleva el trabajo con un espécimen viral de naturaleza patogénica en el laboratorio. Los propósitos de la utilización de estos vectores son variados; siendo posible la transferencia no solo de genes, si no de cualquier otra secuencia genómica como los microRNAs.

En este trabajo se generaron vectores lentivirales (VL) de segunda y tercera generación en células 293FT mediante transfecciones transitorias por el método de lípidos catiónicos con la finalidad de utilizarlos para la sobreexpresión del microRNA 1270 (miR-1270) el cual ha sido encontrado sobreexpresado en monocitos circulantes de mujeres postmenopáusicas osteoporóticas. La expresión de la proteína verde esmeralda fluorescente (EmGFP) codificada por el vector de transferencia (VT) como gen reportero y la observación del efecto citopático en las células transfectadas se tomaron como indicadores positivos de la producción viral. Se exponen las variables consideradas como críticas para la optimización de la generación de altos títulos de vectores lentivirales, así como los resultados obtenidos al modificar cada una de ellas. Con base a estos resultados, se propone una línea de trabajo experimental para continuar con el proceso de optimización con el objetivo de llevar el título viral a por lo menos 10^6 unidades infectivas/ ml.

Con el perfeccionamiento de la técnica de producción de vectores lentivirales en cantidad suficiente se espera que, en un futuro, estos puedan ser empleados para la sobreexpresión del miR-1270 (y otros microRNAs) en monocitos circulantes de manera que se realice en ellos la caracterización funcional del microRNA y con ello ampliar el conocimiento sobre su papel en el proceso de diferenciación de osteoclastos y por ende en el desarrollo de la osteoporosis.

2 Antecedentes

2.1 Remodelado óseo

El remodelado óseo es un proceso dinámico que se lleva a cabo durante toda la vida de un individuo. Por este proceso el esqueleto mantiene su integridad estructural y realiza sus funciones metabólicas. El remodelado óseo es regulado por el sutil equilibrio entre la formación de hueso -mediada por los osteoblastos- y la resorción de hueso -mediada por los osteoclastos-¹.

Los osteoclastos son células gigantes multinucleadas originadas a partir de precursores mieloides hematopoyéticos multipotenciales que se diferencian en osteoclastos maduros mediante interacciones con dos citocinas: el factor estimulante de colonias de macrófagos (CSF-1) y el ligando del receptor de activación del factor nuclear NF- κ B (RANKL)². Las células precursoras de osteoclastos (OCPs), provenientes del linaje Monocito-Macrófago, son formados en la médula espinal y posteriormente atraídos por quimiocinas al torrente sanguíneo donde permanecen hasta ser reclutados por una variedad de factores liberados por las unidades de remodelación ósea (BRUs). Una vez de regreso en el hueso, los OCPs son diferenciados a osteoclastos¹.

Por otro lado, los osteoblastos son derivados de células troncales mesenquimales derivadas de médula ósea (hBM-MSc); las cuales son diferenciadas a osteoblastos maduros³. Algunos de los osteoblastos maduros son retenidos en la matriz y continúan su diferenciación hasta osteocitos; células que pasan a formar parte de la matriz mineral del hueso y mediante señales bioquímicas (factores secretados a la médula espinal o al torrente sanguíneo), mantienen comunicación con las células adyacentes (incluyendo los osteocitos de alrededor, osteoblastos, células endoteliales y posiblemente células en la cavidad medular) e incluso con órganos lejanos⁴.

Durante el proceso de remodelado óseo, los osteoclastos son reclutados al hueso y forman un borde rizado que les permite adherirse estrechamente a la superficie del hueso. Entre los osteoclastos y el hueso, existe un pequeño microambiente aislado y ácido que provoca la degradación de la matriz mineral

ósea. La matriz orgánica del hueso queda entonces expuesta y es degradada por la catepsina K. De manera coordinada los osteoclastos liberan moléculas quimiatractoras para el reclutamiento de osteoblastos. Junto con la proliferación, los osteoblastos tempranos generan una matriz extracelular, la cual contiene colágeno tipo I en abundancia. Una vez que la matriz extracelular madura es mineralizada los osteoblastos continúan diferenciándose¹.

Los complejos procesos de regulación del metabolismo óseo son controlados por diversos factores que incluyen hormonas, citocinas, estimulación mecánica, además de la importante participación de diferentes microRNAs particularmente en los procesos de diferenciación de osteoclastos. El desbalance de alguno de estos procesos de regulación puede conducir al desarrollo de la enfermedad ósea más común: la osteoporosis.

2.1.1 La osteoporosis

La osteoporosis es una enfermedad esquelética sistémica que se desarrolla cuando la tasa de resorción ósea excede la formación de hueso, causando baja masa ósea e incrementando el riesgo de fracturas². La deficiencia de estrógenos, que ocurre principalmente en mujeres postmenopáusicas, y el envejecimiento son los principales factores de riesgo para el desarrollo de osteoporosis⁵.

El creciente número de personas de la tercera edad y el continuo aumento de la esperanza de vida en México, han presentado nuevos retos para el cuidado de la salud; enfermedades que se presentan principalmente en adultos mayores, como lo es la osteoporosis, han aumentado en prevalencia y se pronostica que las cifras de individuos osteoporóticos continuarán aumentando en los próximos años. Se estima que para el año 2025, en México habrá cerca de 2.6 millones de personas con esta enfermedad y para el año 2050 la cifra será de 4.5 millones⁶. El incremento en el número de personas afectadas aumenta también los costos asociados al manejo de la osteoporosis (y la osteopenia, es decir estadíos tempranos de osteoporosis), que para el año 2010 ascendieron a 154.9 millones de dólares; mientras que el costo debido a fracturas por fragilidad alcanzó los 256.2 millones de dólares durante el mismo año⁷.

Aunado a esto, el método considerado como el estándar de oro para el diagnóstico de la osteoporosis: la absorciometría de energía dual de rayos X (DXA por sus siglas en inglés), sigue sin ser el más óptimo para la estimación del riesgo de fracturas ⁷. Por esta razón, la búsqueda de nuevas y mejores estrategias para la detección oportuna de esta enfermedad se vuelve importante.

2.1.1.1 Estrategias terapéuticas para el tratamiento de la osteoporosis

Actualmente, las estrategias preventivas y terapéuticas para los pacientes con osteoporosis están basadas en la suplementación de calcio y vitamina D, terapia de reemplazo hormonal, moduladores de receptores selectivos de estrógenos, inhibidor de RANK ligando (denosumab), uso de agentes farmacéuticos que inhiben la resorción de hueso como los bifosfonatos y, ocasionalmente, la administración de calcitonina^{1,8}. Sin embargo, los tratamientos no son totalmente efectivos e incluso generan efectos adversos considerables.

Al igual que en todos los procesos de patogenia, el estudio a profundidad del desarrollo de la osteoporosis es la clave que permitirá el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas que sean efectivas para la población mexicana y representen un bajo riesgo relacionado con efectos adversos.

2.1.1.2 Modelos de estudio

El entendimiento de los procesos de proliferación, diferenciación, apoptosis de osteoclastos y osteoblastos, así como los mecanismos acoplados entre ellos es vital para el desarrollo de nuevas terapias y fármacos. Los modelos de estudio de estos procesos incluyen modelos animales y celulares. La obtención de precursores de células óseas y su posterior diferenciación in vitro han sido empleadas como un excelente modelo de estudio³. Del mismo modo la generación de modelos animales a los cuales se les puede inducir la disminución de la densidad ósea han abierto las puertas para el estudio de los procesos metabólicos óseos^{2,8}. Sin embargo, estos modelos presentan algunas limitaciones entre las cuales podemos destacar la dificultad de su obtención y

manejo en el laboratorio. Debido a esto, es de crucial relevancia desarrollar nuevos métodos de estudio para las deficiencias del metabolismo óseo.

2.2 Los microRNAs

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños (aproximadamente 22 nucleótidos) no codificantes (ncRNA) de cadena sencilla que son reconocidos como reguladores transcripcionales de la expresión génica. En mamíferos, los microRNAs controlan la transcripción de aproximadamente 50% de todos los genes codificantes^{9,10}.

Los miRNAs actúan uniéndose de manera imperfecta y complementaria a la región no traducida en el extremo 3' (3'-UTR) de un RNA mensajero (mRNA), impidiendo su traducción o induciendo la degradación de este. Los miRNAs tienen roles cruciales en muchos procesos biológicos normales y la expresión alterada de los miRNAs se encuentra asociada con numerosos padecimientos. Conocer los perfiles de expresión y las funciones de los miRNAs en el desarrollo de estas enfermedades, es clave para poder considerarlos como candidatos para el desarrollo de métodos clínicos de diagnóstico y tratamiento¹¹.

2.2.1 Biosíntesis y función de miRNAs

Los microRNAs provienen de transcritos primarios largos (pri-miRNAs), los cuales son transcritos por la enzima RNA polimerasa II^{9,12}. El pri-miRNA es reconocido y procesado por la enzima RNAsa tipo III, conocida como Drosha, asociada a su cofactor DGCR8, este procesamiento genera una molécula en forma de horquilla de 70-100 pb denominada (pre-miRNA)¹³. Esta es reconocida por la proteína de exporte nuclear Exportina 5 y trasladado al citoplasma donde es reclutado por otra RNAsa III denominada Dicer. Dicer se une en el extremo 3' del pre-miRNA y procesa el pre-miRNA para generar un RNA de doble cadena de 22 nt de largo¹². Una o ambas cadenas de este dúplex corresponde a un miRNA maduro, el cual interactúa con una proteína de la familia de las endonucleasas Argonautas (Ago) para formar un complejo de silenciamiento inducido por miRNA (miRISC, por sus siglas en inglés)¹². Este complejo proteico

está formado por tres subunidades: la RNAsa Dicer, Ago y la proteína de unión al RNA TRBP¹⁴. El miRNA guía al complejo RISC hasta sus mRNAs blanco, a los cuales se une por complementariedad induciendo su represión traduccional o bien, su degradación. La secuencia de unión al mRNA dentro del miRNA va del nucleótido 2 al 8 y es conocida como región semilla¹⁴, cuando la región semilla del miRNA es perfectamente complementaria al mRNA, el miRNA funciona como un RNA corto de interferencia (siRNAs) y el blanco es escindido por Argonauta. Por otro lado; cuando la unión del miRNA al blanco es parcialmente complementaria, la regulación de la expresión del transcrito se da ya sea por represión de la traducción o degradación.

La regulación de la expresión genética mediada por miRNAs en mamíferos va acompañada de la degradación de los mRNA en un 85% de las ocasiones¹². La regulación de la expresión génica guiada por miRNAs ha sido implicada en cada una de las vías celulares. Adicionalmente, se han reportado perfiles de expresión de microRNAs específicos de tipo celular^{12,14}. Los estudios funcionales indican que los miRNAs participan en la regulación de casi cualquier proceso celular investigado hasta ahora y que los cambios en su expresión están asociados con muchas patologías humanas. La naturaleza de las interacciones de los miRNAs con su mRNA blanco, la cual involucra el reconocimiento de secuencias cortas, los hace capaces de ejercer efectos combinados con otros miRNAs que actúan sobre el mismo mRNA. Con el potencial de tener docenas o incluso cientos de mRNAs blanco diferentes⁹.

2.3 Osteoporosis y microRNAs

El papel de miRNAs como biomarcadores de enfermedades óseas ha llamado la atención recientemente ya que una gran cantidad de estos han sido identificados como reguladores de los procesos de diferenciación (osteoclastos y osteoblastos), apoptosis y resorción ósea¹. Adicionalmente, varios grupos de investigadores han reportado miRNAs circulantes altamente estables en fluidos corporales incluyendo suero y plasma. Los miRNAs circulantes cumplen con los tres criterios para poder ser utilizados como biomarcadores; ya que son medibles, validables y útiles, por lo que su detección podría servir como método

no invasivo para el diagnóstico molecular de la osteoporosis. Pero, a pesar de que se han reportado diferentes miRNAs circulantes presentes en personas con osteopenia, osteoporosis y fracturas por fragilidad, la especificidad y sensibilidad de los miRNAs circulantes como biomarcadores de la osteoporosis postmenopáusica no han sido establecidas completamente y su potencial permanece sin ser claro⁵.

En la población mexicana, la osteoporosis se ha convertido en un problema de salud pública (se estima que el 17.9% de la población de la ciudad de México padece osteoporosis¹⁵), probablemente debido al incremento de la esperanza de vida de la población mexicana. El estudio del papel que tienen los miRNAs en el desarrollo de esta enfermedad, particularmente en el proceso de diferenciación de osteoclastos, ha resultado en la identificación de la expresión incrementada del miR-1270 en monocitos circulantes de mujeres mexicanas postmenopáusicas osteoporóticas en comparación de aquellas mujeres que son sanas. Así mismo se ha identificado al factor regulador de interferón 8 (IRF8, por sus siglas en inglés) como uno de los genes blanco del miR-1270 que participan en el proceso de diferenciación de osteoclastos¹⁶. El IRF8 es un factor de transcripción que se expresa en células inmunes y ha sido identificado como regulador del remodelado óseo por su papel como supresor de la osteoclastogénesis¹⁷. Así mismo, otros genes como KRAS, STAT2, FOSL2, fueron identificados como posibles blanco del miR-1270 y todos ellos están también implicados en los procesos de remodelado óseo.

El estudio de la función reguladora ejercida por los microRNAs en las enfermedades metabólicas, como la osteoporosis, ha representado un gran reto para la comunidad científica. Uno de los principales problemas es la capacidad de expresión *in vitro* de los microRNAs en los modelos celulares, ya que las líneas celulares empleadas son de difícil transfección y manejo en el laboratorio. Por estas razones, es de gran importancia el desarrollo de nuevos métodos que permitan la expresión de microRNAs en los modelos de estudio, tanto celulares como animales. Los vectores virales, particularmente los lentivirales, representan una luz en el horizonte en este camino.

2.4 Familia *Retroviridae*: género lentivirus

2.4.1 Virus de la familia *Retroviridae*. Generalidades

Los virus son agentes infecciosos cuya cubierta protéica alberga información genética viral, ya sea en términos de DNA o de RNA, pero no de ambos. Se caracterizan por carecer de metabolismo independiente; es decir, no cuentan con los sistemas enzimáticos productores de energía necesarios para la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas. Por ende, no tienen la habilidad de replicarse fuera de alguna célula hospedera viva; situación que los convierte en parásitos intracelulares obligados¹⁸⁻²⁰.

La familia viral *Retroviridae* alberga siete diferentes géneros divididos en dos subfamilias: *Orthoretrovirinae* y *Spumaretrovirinae*; de los cuales solo tres incluyen patógenos humanos²¹. A los miembros de la familia *Retroviridae* se les denomina *retrovirus* de manera general. La figura 1 muestra la distribución de los géneros de la familia *Retroviridae* en las dos subfamilias que la conforman.

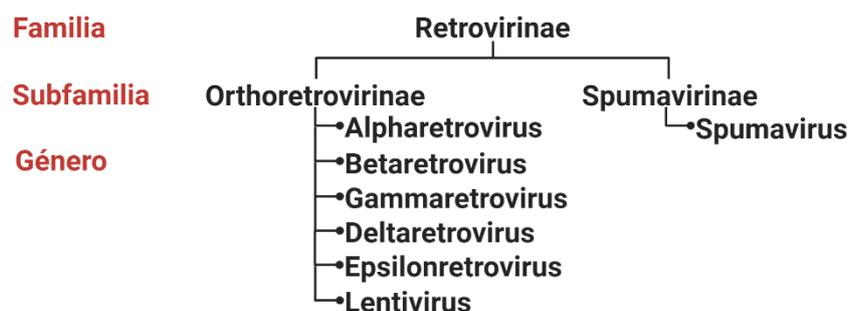


Fig. 1: Familia *Retroviridae*, subfamilias y géneros.

A pesar de que algunos otros virus ocasionalmente insertan sus genomas en el DNA del hospedero, esto es casi siempre un error que no los beneficia. En contraste, los retrovirus deben insertar sus genomas en el DNA del hospedero para poder completar su ciclo de replicación. Cerca del 8% del genoma humano está constituido por secuencias retrovirales siendo un recordatorio de que hemos coexistido con estos virus por millones de años. Aún hoy, se tiene un debate

acerca del proceso evolutivo que conduce a la incorporación y mantenimiento de estas huellas genéticas; algunos autores decretan que los retrovirus han moldeado nuestro genoma y dirigido nuestra evolución²¹⁻²³ a través del tiempo.

El primer retrovirus descubierto fue un virus aviar que provoca tumores en pollos. Fue descubierto en 1911 y nombrado Virus del Sarcoma de Rous (o RSV por sus siglas en inglés) en honor a su descubridor Peyton Rous. A partir del descubrimiento de RSV, se descubrieron otros retrovirus en animales como ratones, ratas y primates. En cuanto a los retrovirus humanos, el primero descubierto fue el Virus T-linfotrópico humano (HTLV-1 por sus siglas en inglés) en 1977 y tan solo unos años después se descubrió el virus de inmunodeficiencia humana (HIV por sus siglas en inglés) como agente causal del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA)²⁴.

Estructuralmente, los retrovirus son virus envueltos cuya cápside, de forma icosaédrica, alberga un genoma diploide de cadena sencilla de RNA (o ssRNA, del inglés single-stranded RNA) de polaridad positiva²⁵⁻²⁷. La característica que le ha merecido el nombre a los retrovirus es la presencia de una enzima retrotranscriptasa o transcriptasa reversa (RT) cuya actividad genera una doble cadena de DNA (dsDNA, este último del inglés double-stranded DNA) a partir de la cadena de RNA. La dsDNA resultante puede alcanzar el genoma de la célula hospedera e insertarse en él; ya sea que se transloque al núcleo de manera activa, como en el caso de los Lentivirus, o que llegue al genoma durante el proceso de mitosis, aprovechando la desintegración de la envoltura nuclear. A partir del sitio de inserción, el genoma viral se estará transcribiendo y el RNA mensajero (mRNA) tendrá dos funciones: servirá como templado para originar las proteínas virales y fungirá como genoma de los viriones progenie. Este particular mecanismo de replicación los coloca en la clase viral número VI según la clasificación de Baltimore¹⁹; la cual separa a los virus de todas las familias en seis diferentes clases dependiendo de la estrategia que cada uno sigue para convertir su genoma en un mRNA que codifique para la síntesis de proteínas virales dentro de la célula hospedera. La figura 2 esquematiza la clasificación de Baltimore de acuerdo al genoma con el que cuenta cada una de las clases y los intermediarios nucleicos que se forman en el proceso de replicación para llegar a la síntesis del mRNA viral.

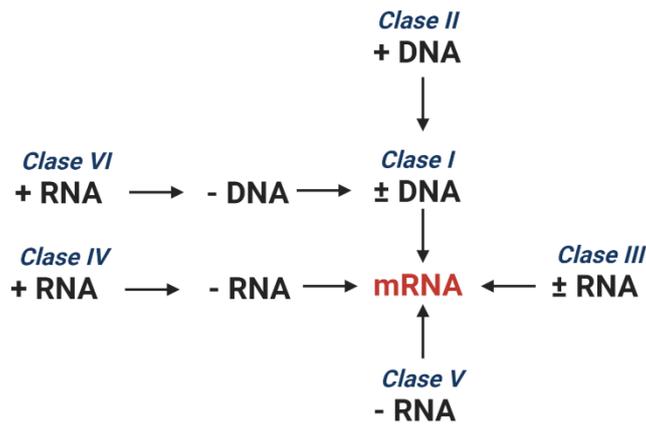


Fig. 2: Clasificación de Baltimore. Los virus de la clase I cuentan con genoma de doble cadena de DNA, el cual convierten en un mRNA de polaridad positiva por medio de la maquinaria de transcripción de la célula hospedera dentro del núcleo. Los virus de la clase II convierten su DNA de cadena sencilla (algunos de polaridad positiva, otros de polaridad negativa) a un intermediario de DNA de doble cadena dentro del núcleo de la célula hospedera; a partir de este se genera el mRNA. Los virus de la clase III contienen genoma de doble cadena de RNA; cuentan con enzimas propias dentro de la cápside para generar un mRNA utilizando como molde la cadena de polaridad negativa. El genoma de los virus de clase IV corresponde a una cadena sencilla de polaridad positiva de RNA, la cual es idéntica al mRNA viral; esta cadena, dentro del citoplasma de la célula hospedera, es utilizada como templado para la síntesis de la cadena complementaria (de polaridad negativa) que a la vez será templado de nuevas moléculas de mRNA. Los virus de la clase V cuentan también con genoma de cadena sencilla de RNA; sin embargo, la polaridad es negativa. Los virus de esta clase utilizan su genoma directamente como templado para la síntesis del mRNA. Por último, los virus de la clase VI cuentan con genoma de cadena sencilla de RNA de polaridad positiva pero difieren de los virus de clase IV porque estos retrotranscriben su genoma en un intermediario de DNA de doble cadena a partir del cual se sintetiza el mRNA²⁸.

Los genomas de todos los retrovirus codifican para tres precursores de poliproteínas (Gag, Gag-Pol y Env) y algunos otros adicionalmente codifican para proteínas con una variedad de actividades regulatorias y auxiliares²². Por esa razón, los retrovirus se clasifican en dos grupos: retrovirus simples y retrovirus complejos. Los retrovirus sencillos se denominan así porque su material genético codifica únicamente para las tres poliproteínas ya mencionadas; mientras que los retrovirus complejos codifican además para algunas proteínas accesorias²⁴. En este entendido, los genes *gag*, *pol* y *env* son comunes a todos los retrovirus y basta con la presencia de estos tres para que un virión sea exitosamente infectivo. La figura 3 muestra la estructura del genoma de un retrovirus sencillo, el cual cuenta con secuencias regulatorias denominadas “Long Terminal Repeat” (LTRs), por sus siglas en inglés, en ambos extremos y con los tres genes esenciales (*gag*, *pol*, *env*).



Fig. 3: Genoma de un retrovirus sencillo. Las secuencias regulatorias que se presentan a cada uno de los extremos contienen señales importantes para el correcto procesamiento del genoma dentro de la célula hospedera como lo son la señal de empaquetamiento y dimerización en el extremo 5' y la señal de poliadenilación en el extremo 3'. Los tres genes esenciales son transcritos como mRNAs policistrónicos, traducidos en poliproteínas y escindidas de manera postraducciona. Las funciones de estos y otros genes retrovirales se explican en la sección de Lentivirus.

Por convención, los genes retrovirales se nombran con tres letras minúsculas en itálicas mientras que el producto codificado por cada gen recibe el mismo nombre, pero con la primera letra mayúscula. Las proteínas resultado del procesamiento proteolítico de los traducidos primarios se denominan con un nombre de dos letras mayúsculas si su función es conocida o con una letra “p” seguida del tamaño del polipéptido si la función se desconoce²⁹. De manera que cuando se habla del gen encontraremos, por ejemplo, el término *gag*, cuando de la poliproteína se trate se encontrará Gag y si se habla de las proteínas individuales de Gag, encontraremos MA, CA o NC.

De todos los géneros de la familia *Retroviridae*, es de especial interés el género Lentivirus debido a las particularidades de los miembros que la conforman; por ejemplo, la habilidad antes mencionada de migrar su genoma viral de manera activa a través de la membrana nuclear para alcanzar el genoma celular.

2.5 Lentivirus

Los *Lentivirus* son virus pertenecientes a la familia viral *Retroviridae*, subfamilia *Orthoretrovirinae*, y comparten con todos los demás miembros de la familia la característica de ser patogénicos. Su genoma cuenta con seis genes adicionales a los tres mencionados como esenciales para los retrovirus; por lo que entran en la clasificación de retrovirus complejos. Se caracterizan por presentar largos periodos de latencia, causando enfermedades cuyos síntomas pueden aparecer hasta 30 años después de la infección.

De acuerdo con el comité internacional de taxonomía de virus (ICTV, por sus siglas en inglés), existen 10 especies de lentivirus y las únicas que infecta células humanas son el Virus de Inmunodeficiencia Humana tipo uno y el tipo dos, (o HIV-1 y HIV-2 por sus siglas en inglés)³⁰. Desde su descubrimiento, la especie

de Lentivirus más estudiada ha sido el HIV-1; no solo por ser el agente causal del SIDA, sino por el potencial terapéutico y de investigación que representa.

2.6 Estructura del virión de HIV-1

El virión de HIV-1 está conformado por una estructura proteica icosaédrica en forma de cono³¹ denominada cápside o *core* cuyo bloque de construcción es únicamente la proteína principal de cápside, CA, codificada por el gen *gag*. Según el modelo computacional, el ensamblaje completo de la cápside de HIV-1 requiere de 286 hexámeros de CA y 12 pentámeros³². Por fuera, la cápside icosaédrica, se encuentra asociada con la proteína de matriz, MA, la cual a su vez se asocia con la envoltura lipídica que rodea de manera externa el virión. Esta estructura -de origen celular- tiene inmersas moléculas de las glicoproteínas de envoltura SU y TM proyectadas como peplómeros, esparcidas por toda la superficie. El diámetro de la partícula viral es de aproximadamente 80-100 nm.

Las dos copias del genoma de ssRNA(+) contenidas en el virión se encuentran asociadas con la proteína de nucleocápside NC en un complejo ribonucleoproteico que es albergado dentro de la cápside. Así mismo, dentro de la cápside es posible localizar varias copias de las proteínas no estructurales IN, PR y RT. Además, cada molécula del genoma cuenta con una molécula de RNA de transferencia (tRNA) unida en el extremo 5', la cual es requerida para el proceso de retrotranscripción. La figura 4 expone un esquema de la estructura viral.

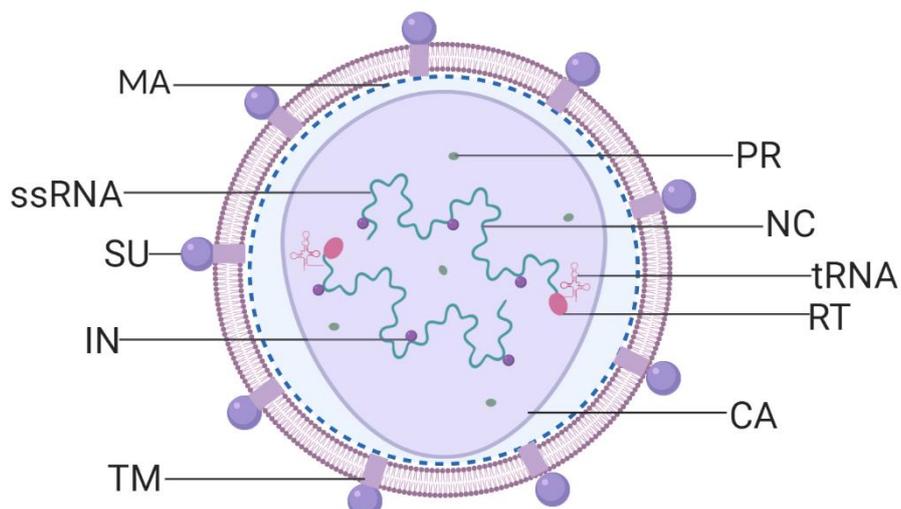


Fig. 4: Estructura del virión de HIV-1. Desde el exterior. Se muestra la bicapa lipídica que conforma la envoltura viral con las dos glicoproteínas de envoltura: TM y SU; TM se encuentra inmersa dentro de la envoltura mientras que SU se proyecta hacia el exterior. La cara interna de la envoltura se encuentra rodeada por la proteína de matriz MA que se asocia con la estructura proteica más próxima al genoma: la cápside viral, esta última se ensambla a partir de hexámeros y pentámeros de la proteína CA arreglados en un icosaedro en forma de cono. La cápside alberga dos moléculas idénticas del genoma viral de ssRNA asociadas a las proteínas de nucleocápside NC. A cada extremo 5' del genoma se encuentra una molécula de tRNA. Encapsuladas junto con el genoma, se encuentran copias de las proteínas enzimáticas RT, PR, e IN.

2.7 Estructura del genoma del HIV-1

Las dos moléculas idénticas de ssRNA(+) que conforman el genoma de HIV-1 son de 9.2 Kb de largo cada una y codifican para nueve genes: los tres genes esenciales para el proceso de replicación (*gag*, *pol* y *env*), dos genes reguladores de la transcripción (*tat* y *rev*) y cuatro genes accesorios responsables de conferir virulencia (*nef*, *vif*, *vpu* y *vpr*)²⁶. La figura 5 muestra la organización de los genes en el genoma proviral de HIV-1; es posible observar que se encuentra flanqueado por las secuencias regulatorias denominadas repetidos terminales largos (o LTR por sus siglas en inglés).

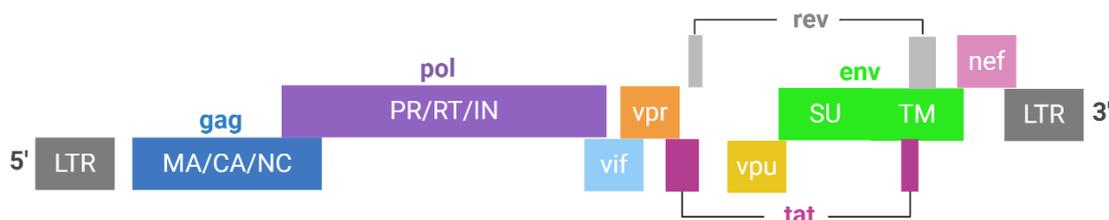


Fig. 5: Genoma de HIV-1. Los nueve genes contenidos en el genoma de HIV-1 se muestran señalados con letras minúsculas en el orden en el que aparecen; se señala con letras mayúsculas los productos proteicos de aquellos genes que se traducen como poliproteínas. Los genes *rev* y *tat* son producto de la transcripción de dos sitios alejados dentro del genoma. Las secuencias LTR flanquean al genoma proviral de HIV-1.

El gen *gag* (por sus siglas en inglés *group-associated antigen*) codifica para la poliproteína Gag; la cual de manera postraduccional es escindida por “splicing” alternativo a tres proteínas estructurales: proteína de cápside (CA), proteína de nucleocápside (NC) y proteína de matriz (MA); y un polipéptido denominado p6³³. El gen *pol* (de polimerasa) junto con el gen *gag* codifican para la poliproteína conjunta Gag-Pol que es escindida en tres proteínas no estructurales: proteasa (PR), retrotranscriptasa (RT) e integrasa (IN). Cada una de estas proteínas tiene su actividad durante el ciclo de replicación y varias copias de estas son encapsuladas por la cápside durante el proceso de ensamblaje. Por otro lado,

Env codifica para la poliproteína glicosilada de envoltura que es escindida en sus dos porciones: superficial (SU) y transmembranal (TM)^{21,22,24,29}.

El producto del gen *tat* (transactivador de la transcripción), la proteína Tat, es una proteína de unión al RNA que funge como activador trans del proceso de elongación de la transcripción del provirus y es esencial para el establecimiento de la infección de HIV *in vivo*^{21,24,26}.

Durante el proceso de replicación viral, se obtienen tres clases de mRNA proviral provenientes de diferentes mecanismos de splicing: el RNA genómico que no sufre splicing (de 9.1 Kb de largo) y que es utilizado para la traducción de Gag y Gag-Pol; un mRNA procesado y empalmado sencillo (de ~4.5 Kb) que codifica para las proteínas Env, Vif, Vpr y Vpu; y varios mRNAs procesados y empalmados dobles (de ~1.8 Kb) que codifican para Tat, Rev y Nef^{21,22} (figura 6).

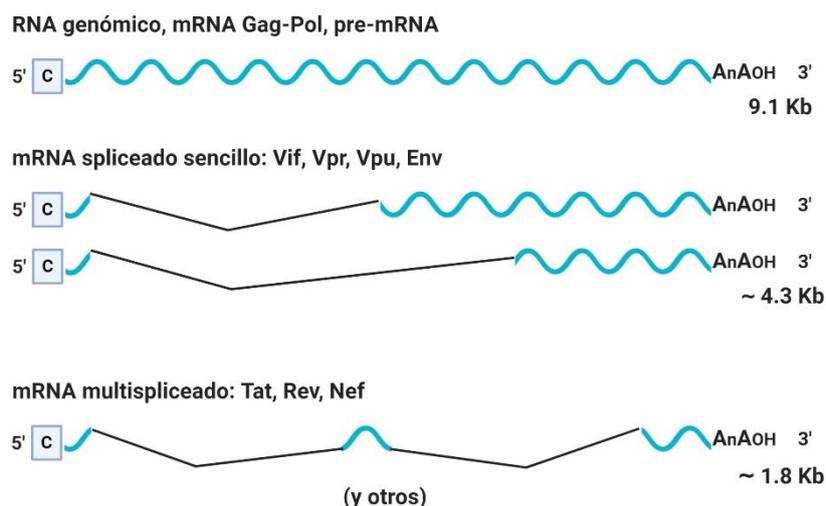


Fig. 6: Conjunto de mRNAs producto de la transcripción del genoma de HIV-1. Se obtienen: 1) Un mRNA genómico no procesado del largo completo (aprox. 9.1 Kb) que codifica para las poliproteínas Gag y Gag-Pol, además sirve como genoma de la progenie viral. 2) Diferentes mRNAs subgenómicos procesados y empalmados sencillos (aprox. 4.5 Kb) que aún contiene intrones, estos codifican para las proteínas Vif, Vpr, Vpu y Env. 3) Diferentes mRNAs subgenómicos procesados y empalmados múltiples veces que no contienen intrones (mRNAs maduros de aprox. 1.8 Kb), estos codifican para Rev, Tat y Nef.

Rev (*Regulator of expression of viron protein*, regulador de la expresión de proteínas virales), codificada por *rev*, es una fosfoproteína que actúa de manera conjunta con la secuencia RRE (elemento de respuesta a Rev) presente en el genoma viral localizada dentro del gen *env*; por lo que está presente en los transcritos de 9.2 y 4.5 Kb pero no en los de 2 Kb (que codifican para Tat, Rev o

Nef). El sitio rico en argininas con el que cuenta Rev puede unirse a RRE en una de sus múltiples estructuras tallo-bucle. Una señal de exportación nuclear en el dominio carboxilo terminal de Rev dirige la exportación del complejo Rev-RNA hacia el citoplasma. Una vez que el RNA ha cruzado, este complejo se disocia y las moléculas de Rev pueden reciclarse al núcleo guiados por la señal de localización nuclear^{21,24}. En ausencia de Rev, los transcritos de 9.2 y 4.5 Kb - que presentan intrones- son retenidos en el núcleo y es hasta que Rev comienza a acumularse que el rango completo de mRNAs de HIV puede ser exportado y queda disponible para su traducción²¹.

La proteína Vpu (*Viral protein unique*, proteína viral única) es una fosfoproteína integral de membrana que promueve la degradación de CD4 -el receptor primario de HIV- en el retículo endoplásmico. La proteína Vpu, además promueve la liberación del virión por gemación²¹. Vpu interactúa con los CD4 sintetizados de novo en el retículo endoplásmico y recluta al complejo SCF (denominado así por tres de sus cuatro componentes: SKP1, culina, proteína con motivo F; el cuarto componente es una proteína con motivo RING denominada Rbx1³⁴) ubiquitín ligasa para mediar la poliubiquitinación y degradación proteosomal de estos. En otras palabras, Vpu funge como adaptador para reclutar moléculas de CD4 para su degradación; facilitando la liberación de las partículas virales formadas al evitar la formación de complejos SU/CD4 en el retículo endoplásmico. Por otro lado, en ausencia de Vpu, el virión permanece unido a la membrana plasmática, ya que la teterina (una proteína de membrana inducida por interferón que inhibe la salida de partículas virales envueltas de las células infectadas) bloquea la liberación de los viriones. La teterina tiende a formar enlaces cruzados entre la célula y el virión debido a su membrana dual de anclas. Vpu bloquea la incorporación viral de teterina secuestrándola en el Golgi²⁴.

La proteína Vpr (*Virion protein R*, proteína viral R) asiste el transporte del complejo de pre-integración dentro del núcleo por lo que no se requiere para la propagación del HIV en células divisibles, pero si para la propagación en células no divisibles. Es también un activador transcripcional débil de los LTR de HIV y otros promotores celulares²¹. Se encuentra empaquetada dentro de la cápside a diferencia de otras proteínas accesorias. Se han reportado varias actividades de

Vpr, entre ellas el arresto del ciclo celular en la fase G2/M e inducción de apoptosis²⁴.

Además de las regiones codificantes, el genoma retroviral contiene diferentes secuencias regulatorias importantes. A cada extremo del genoma se encuentra una secuencia de aproximadamente 40 nucleótidos denominada largo repetido (R), esencial para el proceso de transcripción reversa. Seguido de la secuencia R, del extremo 5', se encuentra la secuencia U5 (de único en el extremo 5') y río arriba de la secuencia R, del extremo 3', se encuentra la secuencia U3 (de único en el extremo 3'). Adicionalmente, en el extremo 5' seguido de U5, se encuentra el sitio de unión al primer (PBS) y justo después de PBS, la señal de empaquetamiento del RNA denominada psi (ψ)^{22,29}. Los sitios U3 y U5 se duplican en el extremo contrario al que se encuentran inicialmente durante el proceso de retrotranscripción dando lugar a las LTRs.

2.8 Ciclo de replicación viral de HIV-1

2.8.1 Unión, fusión y liberación

En el proceso de regulación del ciclo de replicación viral participan tanto proteínas virales como proteínas celulares. La cápside, con todos sus niveles proteicos, es la estructura más próxima al material genético viral; de manera que le da forma al virión. Sin embargo, es la envoltura viral la estructura que participa en los procesos de unión, anclaje y fusión que tienen lugar en la primera etapa del ciclo de replicación viral. Esta bicapa lipídica tiene inmersas las proteínas virales de envoltura codificadas por el gen *env*, SU y TM, las cuales se encuentra glicosilada. En SU es donde se encuentra el dominio de unión al receptor (RBD, por sus siglas en inglés *Receptor Binding Domain*), responsable de la unión específica del lentivirus con el receptor de alguna célula susceptible a la infección²⁶.

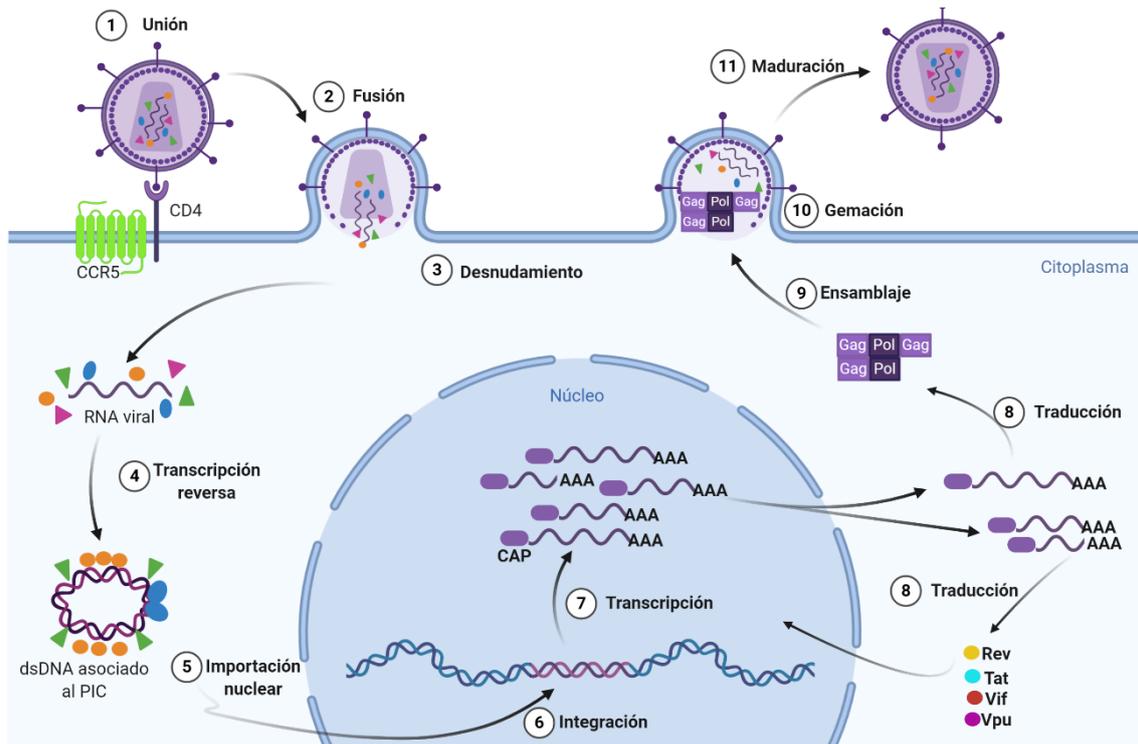


Fig. 7: Ciclo de replicación de HIV-1. (1) La proteína SU se une al receptor CD4 e interactúa con el correceptor CCR5, (2) acción que deja expuesto el péptido de fusión contenido en TM provocando la fusión de la envoltura con la membrana celular. (3) El contenido de la cápside es liberado en el citoplasma y (4) la transcriptasa reversa comienza con la síntesis de un precursor de dsDNA el cual interactúa con IN dentro de un complejo de pre-integración (PIC, por sus siglas en inglés). (5) El PIC es trasladado al núcleo dirigido por las señales de importación nuclear presente en IN; (6) esta misma enzima cataliza la integración del DNA proviral en el genoma hospedero. (7) A partir de la molécula integrada, se producen los diferentes transcritos de RNA viral que sirven como genoma de la progenie y (8) como templado para la traducción de todo el conjunto de proteínas virales. (9) las poliproteínas Gag y Gag-Pol se ensamblan en la cara interna de la membrana celular en los sitios donde las proteínas de membrana SU y TM se han colocado previamente, (10) este enrejado de Gag y Gag-Pol se empaqueta dentro de las partículas virales en gemación; (11) una vez liberadas, comienza la maduración del core viral donde las poliproteínas son escindidas por PR para dar lugar a una nueva partícula viral.

El ciclo de replicación (figura 7) comienza con la unión de SU al receptor CD4 (receptor primario de HIV en linfocitos T CD4+ y células del linaje de los macrófagos) de las células hospederas dejando expuesto, en el virión, un sitio de unión al correceptor de quimiocina presente en la célula. Diferentes cepas de HIV interactúan con diferentes correceptores de quimiocinas siendo CCR5 (Receptor 5 de quimiocina C-C o receptor 5 de quimiocina cisteína-cisteína), presente en macrófagos, y CXCR4 (Receptor 4 de quimiocina C-X-C), expresado en linfocitos T CD4+ los más comunes²⁴.

La interacción entre SU y el correceptor provoca un cambio conformacional en la proteína TM que deja expuesto el péptido de fusión -localizado en el extremo

amino terminal de TM- lo que conlleva a la fusión independiente de pH de la membrana citoplasmática y la envoltura viral^{21,22}.

Posteriormente el core retroviral es liberado en el citosol y la RT, contenida en el virión, comienza con la transcripción reversa del genoma; produciendo una molécula de dsDNA a partir de una de las copias de ssRNA(+)

2.8.2 Transcripción reversa

La enzima encargada del proceso de transcripción reversa es denominada retrotranscriptasa (RT) y corresponde a un heterodímero con dos dominios diferentes tanto en tamaño como en actividad: el polipéptido más largo tiene actividad de DNA polimerasa dependiente de RNA, mientras que el polipéptido corto tiene actividad de RNasa H²². Es en la partícula viral parcialmente desintegrada y liberada en el citoplasma donde la transcripción inversa comienza. Las moléculas de tRNA asociadas al genoma tienen complementariedad con el sitio de unión al primer (PBS del inglés Primer Binding Site) localizado en seguida de la U5 del extremo 5' (ver figura 8).

Utilizando el tRNA asociado al genoma viral como primer, la transcriptasa reversa comienza con la síntesis de una cadena de cDNA (ssDNA (-) por DNA de cadena sencilla de polaridad negativa) utilizando como molde la cadena sencilla de RNA (+); en dirección 5'-3'. La hebra de RNA de esta molécula híbrida RNA/DNA es digerida por el dominio RNasa H de RT. La pequeña cadena de ssDNA(-) migra del extremo 5' al extremo 3' del templado de RNA, esto es posible porque la secuencia R de DNA recién sintetizado es complementario a la secuencia R de RNA en el extremo 3'. La RT continúa la síntesis de la hebra de ssDNA(-) en dirección 5'-3'. A la par, la mayor parte del templado de RNA de polaridad positiva es digerido por el dominio RNasa H de la transcriptasa reversa. Un sitio de este templado de ssRNA(+) permanece sin digerir: el denominado tracto de polipurina (PPT por sus siglas en inglés). El PPT sirve como cebador de la síntesis de la cadena de ssDNA(+), utilizando la nueva cadena de ssDNA(-) como templado; la RT sintetiza, en dirección 5'-3', un pequeño fragmento de DNA de polaridad positiva que incluye la secuencia de PBS tomada del primer tRNA que sigue unido a la cadena de DNA de polaridad negativa. Posteriormente

el tRNA es digerido por la RNasa H. La nueva secuencia del PBS en el ssDNA(+) es, entonces, complementaria a la que existe en el extremo 3' del ssDNA(-) y, de manera similar al primer salto, este fragmento de ssDNA(+) se mueve al extremo 3' del ssDNA(-). Por último, se termina la síntesis de la molécula de dsDNA por extensión de las dos hebras: la positiva y la negativa^{21,22}, en dirección 5'-3'. El detalle de este proceso se ilustra en la figura 8.

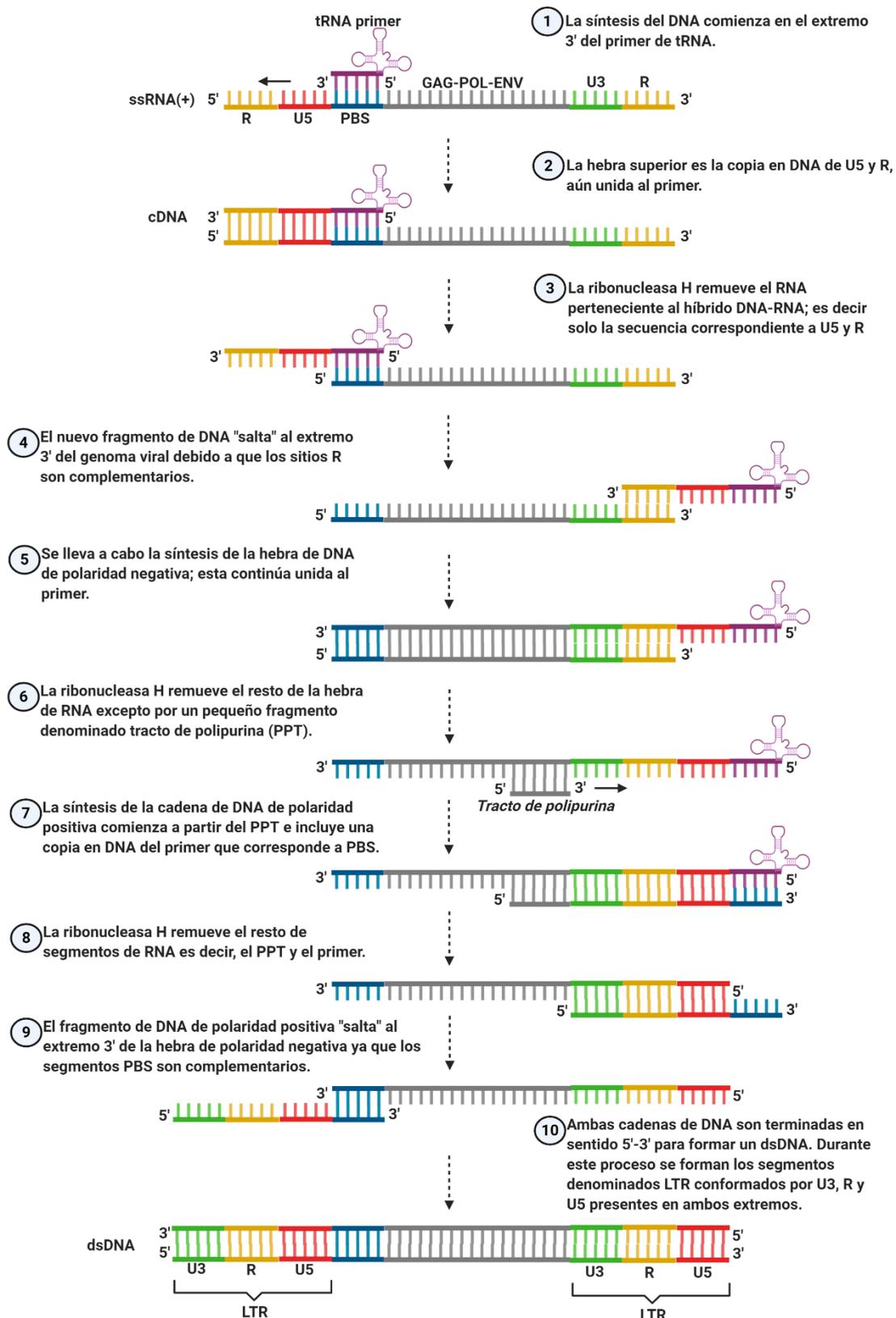


Fig. 8: El proceso de transcripción reversa. La transcripción reversa del genoma de ssRNA(+) de los retrovirus es realizado por la enzima transcriptasa reversa (RT), la cual cuenta con dos actividades: la de DNA polimerasa dependiente de RNA y la de ribonucleasa H. El proceso comienza con la unión del primer de tRNA al sitio de unión al primer (PBS) y termina con la síntesis de una doble cadena de DNA (dsDNA) que contiene los sitios de regulación de la transcripción denominados repetidos largos terminales (LTR) en ambos extremos.

Originalmente, el genoma viral contiene las secuencias R/U5 y U3/R en los extremos 5' y 3' respectivamente, las cuales, debido a los dos saltos realizados durante la transcripción inversa, son copiados parcialmente en el extremo contrario formando los repetidos largos terminales o LTR's (del inglés long terminal repeats). La secuencia de los LTRs es: U3/R/U5, en ambos extremos del dsDNA. De manera que, la versión de DNA del genoma lentiviral es más larga que el genoma de RNA. Los LTRs son importantes porque contienen secuencias regulatorias críticas, incluyendo una región enhancer/promotor con sitios de unión para proteínas regulatorias²² y la señal de poliadenilación del mRNA retroviral (presente en la unión R/U5 de cada LTR; sin embargo, esta señal se suprime en el LTR 5').

Cabe mencionar que en el proceso de transcripción inversa, no solo la RT participa, sino que hay otras enzimas involucradas, como NC, CA e IN, que forman parte del complejo de pre-integración (PIC)²² en el cual se integra también la hebra de dsDNA.

2.8.3 Integración

La integración del genoma viral, en su versión de DNA, dentro del genoma hospedero requiere la formación de un complejo de pre-integración o PIC en el que la enzima principal es la proteína viral IN. Esta proteína forma dímeros y tetrámeros que se unen a los extremos de la dsDNA manteniéndolos unidos en un arreglo circular.

El PIC migra hacia el núcleo a través de los microtúbulos celulares y, mediante señales de importación nuclear presentes en IN, atraviesa la membrana nuclear. Como se ha mencionado antes, esta característica aplica únicamente al género de los Lentivirus, incluidos HIV-1; ya que solo ellos tienen la capacidad de cruzar de manera activa los poros nucleares para obtener acceso al genoma celular. Esta propiedad les permite infectar células no divisibles (células en reposo o en fase G0) como los macrófagos. El resto de los retrovirus pueden infectar células solo cuando estas se encuentran en la fase de mitosis y la membrana nuclear se desintegra permitiéndoles alcanzar el genoma del hospedero.

Una vez dentro del núcleo, la proteína viral CA interactúa con PIC y el complejo de poliadenilación alternativa (que contiene la subunidad 6 del factor específico de escisión y poliadenilación, CPSF6) para dirigir el genoma de HIV-1 a segmentos de cromatina transcripcionalmente activa, donde la interacción entre IN y el factor de crecimiento epidérmico (LEDGF) conduce a la integración dentro de los cromosomas ricos en H3K36me³⁵ (Histona 3 trimetilada en el aminoácido lisina 36).

El proceso de integración (figura 9) se realiza mediante las tres actividades de IN: 1) por su actividad de exonucleasa, escinde de dos a cuatro nucleótidos del extremo 3' del dsDNA no integrado; 2) como endonucleasa, realiza un corte en el DNA de la célula hospedera liberando extremos cohesivos; 3) y como ligasa, cataliza la unión covalente entre el DNA viral y el DNA de la célula hospedera²² volviéndolos una sola molécula.

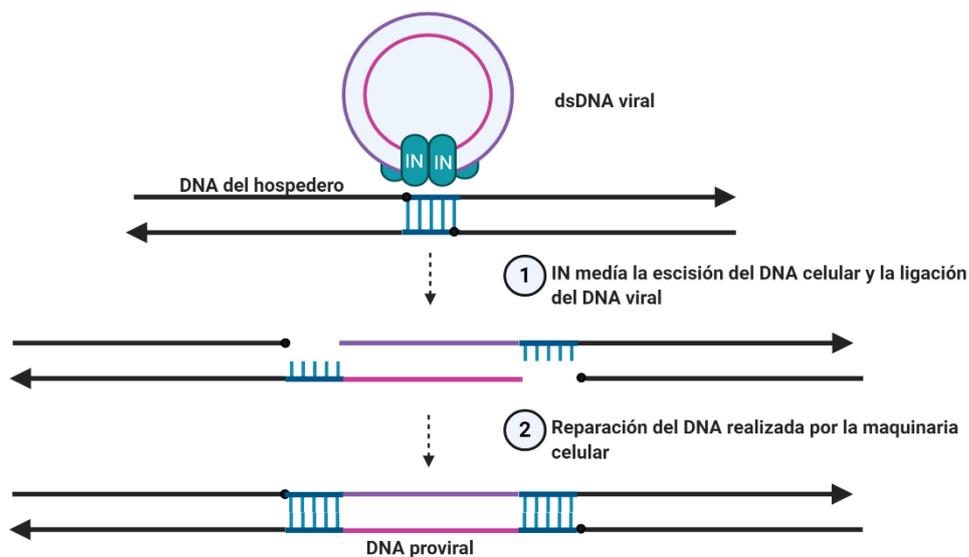


Fig. 9: Integración de la dsDNA en el genoma del hospedero.

Además de las copias de dsDNA integradas en el DNA celular -ahora denominado provirus-, diversas formas de DNA de HIV-1 no integradas se encuentran en abundancia dentro del núcleo durante la infección, incluyendo los círculos LTR sencillos, círculos LTR dobles y formas lineares. Se cree que estas formas no integradas pueden tener un papel importante en la replicación; ya sea como templado para la expresión temprana de algunos genes o posiblemente como otro reservorio potencial de material genético de HIV disponible durante el curso de la infección²¹.

Se considera que después de la integración del dsDNA al DNA celular en forma de provirus, se termina la primera fase del ciclo de replicación viral y los denominados pasos tempranos de la replicación; los pasos que ocurren después, son denominados pasos tardíos¹³.

2.8.4 Transcripción del genoma proviral

La transcripción del genoma proviral se lleva a cabo únicamente en células activadas; por lo que la activación de las células T (provocada por mitógenos, citocinas, proteínas trans-activadoras codificadas por algunos virus, etc.²¹) es necesaria para comenzar con la segunda fase de la replicación lentiviral. Por esta razón, las enfermedades provocadas por los lentivirus pueden tardar años en producir algún síntoma; ya que la replicación viral se queda detenida pasada la integración y puede pasar mucho tiempo antes de que una célula infectada sea activada y pueda entonces comenzar con la producción de partículas virales. La expresión del DNA proviral se encuentra a cargo ahora de la maquinaria de transcripción de la célula hospedera y el proceso de transcripción es dirigido por la RNA polimerasa II (RNA pol II)²⁶. Para ello, la RNA pol II requiere de la actividad del trans-activador Tat que actúa uniéndose a TAR para el aumento de la procesividad de la enzima. Gracias a la actividad de esta proteína es posible obtener los mRNAs genómicos que, posteriormente podrán ser utilizados como genoma de la progenie viral.

2.8.5 Traducción de proteínas virales

Los primeros mRNAs que son exportados para su traducción son aquellos a los que se les han removido por completo los intrones, entre ellos los mRNAs codificantes para Rev y Tat; las cuales, una vez traducidas, regresan al núcleo para auxiliar en el proceso de generación y exportación de los demás tipos de mRNA.

El mRNA genómico es traducido en dos poliproteínas: Gag y Gag-Pol. La traducción de la poliproteína fusionada Gag-Pol ocurre de manera poco frecuente cuando, en un 10% de las veces, la traducción de Gag no termina al finalizar la secuencia del gen *gag*²⁶ debido a la presencia en el mRNA de una

secuencia deslizante y una estructura de pseudonudo³⁶; señales interpretadas por el rRNA (RNA ribosomal) que provocan un desplazamiento del marco de lectura en la dirección -1³⁷. La poliproteína Gag contiene los dominios para MA, CA y NC mientras que Gag-Pol contiene los dominios de RT e IN. El dominio PR es a veces parte de Gag y otras veces parte de Gag-Pol; ya que los retrovirus han desarrollado una gran variedad de estrategias para producir PR.

Por otro lado, la poliproteína ENV es traducida a partir de un mRNA subgenómico de 4.5 Kb. En el lumen del retículo endoplásmico, ENV es escindida en SU y TM. Ambas son glicosiladas conforme viajan a través del retículo endoplásmico y el Golgi²².

Una vez que las poliproteínas estructurales virales han sido traducidas y su concentración aumenta, se combinan con las moléculas de mRNA viral genómico para formar las partículas virales que geman a partir de la membrana celular²⁴.

2.8.6 Ensamblaje, gemación y maduración

El ensamblaje de las partículas virales comienza con el procesamiento y glucosilación de las proteínas de envoltura SU y TM, así como la miristilación del extremo N-terminal del elemento p17 en las poliproteínas Gag y Gag-Pol²¹. El ensamblaje y la gemación de las partículas virales ocurre en la membrana citoplasmática, específicamente en zonas ricas en colesterol denominadas balsas lipídicas²⁶ donde las proteínas de envoltura glucosiladas se insertan y forman los peplómeros de la envoltura que será adquirida tras la gemación. La interacción entre la cola citoplasmática de TM y el amino terminal de MA (en la poliproteína Gag) funciona como señal de localización para las poliproteínas Gag y Gag-Pol a la zona de gemación. A esta zona, dos moléculas del mRNA viral no procesado son reclutadas por la poliproteína Gag. Las partículas del *core* comienzan a ensamblarse por la interacción Gag-Gag entre las poliproteínas Gag y Gag-Pol; el dominio MA queda entonces anclado a la superficie de la membrana interna, mientras que el dominio NC (en la poliproteína Gag), interactúa con el RNA viral³²; la capacidad que tiene el dominio NC de unión al RNA permite que el RNA viral sea utilizado como un andamio durante el proceso

de ensamblaje. La incorporación del genoma de RNA dentro de las partículas virales requiere de secuencias específicas en el RNA viral: la denominada señal de empaquetamiento o psi (ψ) localizada cerca del extremo 5'. Sin esta secuencia ψ el RNA no puede ser empaquetado²⁶.

La liberación de los viriones puede producirse rápidamente provocando la lisis celular, o bien en forma más lenta manteniendo la integridad de la célula. Cuando las partículas lentivirales geman a partir de la membrana, adquieren su envoltura de lípidos. En este punto, las partículas virales se encuentran inmaduras porque las poliproteínas Gag y Gag-Pol no han sido procesadas. La maduración de las partículas virales, es decir la escisión de las poliproteínas en sus componentes individuales, se realiza por acción de la proteasa viral²⁰. Para ello, la PR se auto escinde de la poliproteína Gag-Pol y continúa con la escisión aspartil sitio-específica de los demás componentes. Durante la maduración viral, Gag es cortado por PR, generando MA, CA y NC. El procesamiento proteolítico realizado por PR provoca un re-arreglo de Gag, dejando solo a MA asociada a la envoltura lipídica viral, mientras que CA y NC quedan condensadas alrededor del genoma. NC forma un complejo ribonucleoproteico (RNP) dentro del virión, y CA se ensambla en una rejilla que finalmente generará la cápside³² o *core*. Este proceso resulta en la condensación del core en su forma infecciosa madura³⁸ como último paso del ciclo de replicación viral.

2.9 Vectores virales

2.9.1 Vectores virales frecuentemente utilizados

Los vectores virales se encuentran entre las herramientas más utilizadas para la entrega de genes ya sea para terapia génica o con fines de investigación. Estos métodos virales se dividen en dos: los integrativos y los no integrativos. Debido a su habilidad de integrarse en el genoma de las células hospederas, los vectores virales integrativos tienen la desventaja de ser potenciales oncogénicos; sin embargo, cuando se requiere que la expresión viral se de a largo plazo, estos son los más útiles. Entre los vectores virales no integrativos encontramos los adenovirus (Ads); el virus del herpes simple (HSH); los retrovirus, a excepción de los de la familia lentivirus y los alphavirus (género

dependovirus, familia *Parvovirus*). Por otro lado, los representantes de los vectores virales integrativos son los virus asociados a los adenovirus (AAV por sus siglas en inglés) y los retrovirus de la familia lentivirus³⁹.

Además de la característica de integrarse o no en el genoma, cada uno de estos vectores virales presentan particularidades en cuanto a la capacidad de genoma externo que pueden empaquetar o el rango de células hospederas que pueden infectar. La elección del virus para su uso en el laboratorio debe basarse en la consideración de estas características y la naturaleza del ensayo. La tabla 1 muestra la comparación de características entre los vectores mencionados.

Tabla 1. Vectores virales utilizados para la entrega de genes. Tomado de ³⁹⁻⁴¹

Vector	Capacidad de empaquetamiento	Rango de hospedero	Características
Virus asociados a los adenovirus	Baja <4 Kb	Amplio, infecta tanto células divisibles como no divisibles.	Lento inicio de la expresión génica, integración del genoma, expresión a largo plazo, producción de virus ineficiente a gran escala, naturalmente incompetentes en la replicación, baja inmunogenicidad.
Adenovirus	Media <7.5 Kb	Amplio, esto puede llegar a ser una limitante para su uso.	Expresión transitoria, alta inmunogenicidad, no oncogénicos. Se requieren altos títulos para infectar ciertos tipos celulares. Fácil producción a gran escala. Los ejemplares los virus Ad2 y Ad5 son los más utilizados.
Alphavirus	Media <7.5 Kb	Amplio, cepas específicas para neuronas y células gliales.	Niveles de expresión transitorios pero elevados, baja inmunogenicidad.
Virus del herpes simple	Alta >30 Kb. Casi todo su genoma puede ser reemplazado por transgenes	Amplio, neuronas, células madre, células musculares.	Infección latente, expresión a largo plazo, baja citotoxicidad. Fácil producción a gran escala. Naturalmente neurotrópico.
Lentivirus	Media 8 Kb	Amplio, células divisibles y no divisibles.	Integración del genoma, expresión a largo plazo, seguros a títulos bajos. Producción a gran escala ineficiente. Basados en el ejemplar HIV-1.

Retrovirus	Media 8 Kb	Restringida, células divisibles solamente.	Integración del genoma, expresión a largo plazo, baja inmunogenicidad, naturalmente oncogénicos. El género más utilizado es el γ -retrovirus
-------------------	------------	--	--

En este trabajo, particularmente, se eligieron los vectores lentivirales como herramienta a desarrollar esperando que, al optimizar su producción, sean útiles para la entrega del miR-1270 en células monocíticas, que no son divisibles. A continuación se explica más ampliamente cómo se encuentran conformados los sistemas de vectores lentivirales; cuyo prototipo está basado en el ejemplar HIV-1, el único lentivirus que infecta células humanas^{40,42,43}.

2.9.2 Vectores lentivirales (VL): sistemas basados en HIV-1

A pesar del gran potencial demostrado por los vectores lentivirales en la entrega de genes, el uso de los vectores lentivirales derivados del HIV-1 patógeno, exige tomar consideraciones de bioseguridad; ya que, a diferencia de otros géneros virales que también son utilizados como vectores, los lentivirus no son naturalmente deficientes en el proceso de replicación. El desarrollo de sistemas seguros para su uso en el laboratorio ha involucrado diferentes cambios en la cantidad y forma en que se presenta el genoma viral, los cuales se han acumulado de una generación de sistema de vectores a otra.

Debido a que algunos componentes de los vectores lentivirales son citotóxicos y a que se busca que su replicación sea defectuosa, los vectores lentivirales son generalmente producidos por co-transfección transitoria de plásmidos⁴⁴ en líneas celulares de empaquetamiento. De manera que el sistema se conforma por dos componentes: 1) un conjunto de construcciones vectoriales que llevan el transgén a ser entregado y proveen la información genética necesaria para producir el virus recombinante; y 2) una línea celular que provee la maquinaria requerida para la construcción de las partículas lentivirales, denominada línea celular de empaquetamiento^{18,39}. El conjunto de plásmidos que conforman cada sistema deben ser introducidos de manera conjunta a una misma célula; ya sea por transfección o electroporación⁴⁵. Uno de estos plásmidos corresponde al vector de transferencia (VT) el cual, contiene el gen de interés dentro de un

esqueleto lentiviral, y el resto son los plásmidos de empaquetamiento donde uno de ellos codifica para la glicoproteína de envoltura del virus de estomatitis vesicular (VSV-G por sus siglas en inglés) y los demás para genes esenciales de HIV-1. El empleo del gen de VSV-G en lugar de las proteínas de envoltura SU y TM tiene la finalidad de aumentar el tropismo de los vectores resultantes; los cuales, se dice que son virus “pseudotipificados” ya que han sido modificados al incorporar proteínas de un virus heterólogo (el virus de estomatitis vesicular) en su estructura⁴⁶. El aumento del tropismo de los lentivirus pseudotipificados se debe a que la glicoproteína VSV-G se une al componente de membrana fosfatidilserina, el cual es ubicuo, permitiendo que los vectores pseudotipificados transduzcan un rango marcadamente más amplio de células (comparado con su análogo SU, cuyo sitio de unión al receptor reconoce únicamente a CD4). Además, VSV-G es mucho más estable que SU y TM, permitiendo que los virus pseudotipificados sean concentrados por ultra centrifugación para aumentar el título de las cosechas³⁰. La alta eficiencia de infección y amplio tropismo celular de los vectores lentivirales pseudotipificados con la glicoproteína del virus de estomatitis vesicular (VSV-G) los ha convertido en el estándar con el cual otros pseudotipos virales son comparados⁴⁷.

El problema a combatir durante el uso de estos vectores como herramienta es, entonces, el surgimiento de lentivirus recombinantes competentes para la replicación (RCLs por sus siglas en inglés); ya sea mediante recombinación entre el vector de transferencia y las secuencias de las construcciones de empaquetamiento o con las secuencias retrovirales endógenas humanas (HERV del inglés *human endogenous retroviral*)⁴⁶. Los HERVs tienen una estructura de provirus común: con marcos de lectura codificantes abiertos flanqueados por dos repetidos largos terminales. Sin embargo, a lo largo del curso de la evolución y como consecuencia de los mecanismos de defensa del hospedero, muchas de las secuencias contienen INDELS (inserciones o deleciones), mutaciones o han sido reducidos a un solo LTR por recombinación. Estos INDELS y demás mutaciones reducen la actividad de las secuencias HERV; además la expresión de los HERVs es controlada por diferentes mecanismos epigenéticos⁴⁸ de manera que estas secuencias no son capaces por sí solas de generar una partícula lentiviral competente en la replicación.

Las características de los vectores lentivirales les confieren la capacidad de ser utilizados para el análisis funcional de genes mediante la construcción de un vector de transferencia (VT) que sobreexpresa un microRNA (miRNA) para el abatimiento de la expresión de sus genes blanco. Este puede ser una manera efectiva de estudiar los efectos a corto plazo del silenciamiento de la expresión de genes⁴⁵. Sin embargo, cabe resaltar que el HIV-1 es un virus del grupo de riesgo 3 (risk group 3 o RG3); por ello, los vectores derivados de este deben ser manejados en laboratorios de bioseguridad nivel 3 (BL3) en consideración al riesgo de producción de patógenos.³⁰

2.9.3 Sistema de Vectores Lentivirales de Primera Generación

Los vectores lentivirales de primera generación no fueron el primer intento de utilizar a los Lentivirus como vehículos en la entrega de genes pero si representaron el primer intento de generar partículas lentivirales deficientes en la replicación; de manera que el ciclo de vida de los vectores se reduce a un solo ciclo de infección²⁵.

Este sistema de vectores lentivirales se encuentra conformado por tres plásmidos: un plásmido de empaquetamiento, un plásmido de envoltura y el vector de transferencia (VT) (figura 10). De los nueve genes de HIV-1, el único que no es codificado por alguno de estos plásmidos es Env, el cual es sustituido por VSV-G con el propósito de generar un HIV-1 pseudotipificado de mayor tropismo. La VSV-G es el único gen codificado por el plásmido de envoltura. Los genes *gag*, *pol*, *vif*, *vpr*, *vpu*, *rev*, *tat* y *nef* son codificados dentro del plásmido de empaquetamiento al igual que la secuencia regulatoria RRE. El vector de transferencia contiene las secuencias regulatorias RRE, ψ y LTRs, además del transgén. Como el transactivador Tat no es codificado por el VT, la actividad promotora del 5'TLR es mínima. En su lugar, los genomas transferidos usan un promotor interno (promotor CMV) para expresar el transgén en las células infectadas^{30,33}.

La complementación en trans de los productos de los genes codificados por el vector de empaquetamiento y de envoltura, permite la producción de virus que pudieran realizar un primer ciclo de infección, pero no un segundo debido a que

la información genética de las partículas resultantes no contiene, en principio, ninguno de los genes de HIV-1. A pesar de esta separación de genes en diferentes plásmidos, los vectores de primera generación siguen presentando un riesgo; ya que, si bien requieren de dos eventos de recombinación para producir un RCL, en caso de que esto llegara a ocurrir el virus resultante contaría con 8 de los nueve genes de HIV-1 patógeno (incluyendo aquellos que confieren virulencia) y aún más, presentarían un tropismo aumentado (por la pseudotipificación con VSV-G). El uso de VSV-G también reduce la posibilidad de recombinación ya que elimina las secuencias homólogas entre Env y el VT³⁰.

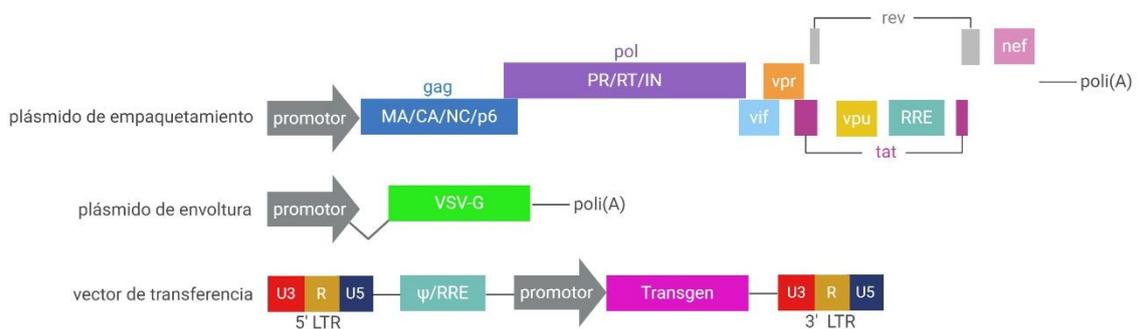


Fig. 10: Plásmidos del sistema de primera generación de vectores lentivirales basado en HIV-1. El denominado “plásmidos de empaquetamiento” (en inglés *packaging plasmid*) contiene todos los genes de HIV-1 excepto el gen *env*. El gen *env* es sustituido por VSV-G en el plásmido de envoltura. Únicamente el vector de transferencia (VT) contiene las LTRs reguladoras y la señal de empaquetamiento; este es el plásmido que contiene la secuencia a transducir por los vectores resultantes.

2.9.4 sistema de Vectores Lentivirales de Segunda Generación

Para incrementar aún más la seguridad, los vectores de segunda generación tienen como principio un cambio en el número de genes del HIV-1 contenidos en este sistema. Las proteínas accesorias de HIV-1: Vif, Nef, Vpu, Vpr pueden ser eliminadas sin afectar el ciclo de replicación viral en líneas celulares; sin embargo, son necesarios para la propagación en células primarias o *in vivo*. Por ejemplo, los linfocitos son resistentes a la replicación de HIV-1 deficientes en *vif*. Vif es necesario para inactivar un factor antiviral del hospedero, APOBEC3G. De manera similar, Vpu neutraliza otro factor antiviral celular, denominado Teterina. Por otro lado, Nef promueve la degradación de proteínas del hospedero, como MHC clase I y CDA, para aumentar la producción viral y evadir la respuesta inmune del hospedero³⁰.

Estos vectores lentivirales eliminan la presencia de todos los genes no esenciales para la creación de una partícula lentiviral que pueda cumplir de manera eficiente la primera parte del ciclo de replicación; es decir solo los eventos tempranos, hasta la integración del genoma contenido dentro de la célula infectada. De manera que, los vectores de segunda generación (figura 11) incluyen solo cuatro de los nueve genes de HIV: *gag*, *pol*, *tat* y *rev*.

Si se llegan a dar los dos eventos de recombinación requeridos para formar un RCL, este tendría solo los genes esenciales de HIV-1 sin ninguno de los genes que confieren virulencia o citotoxicidad.

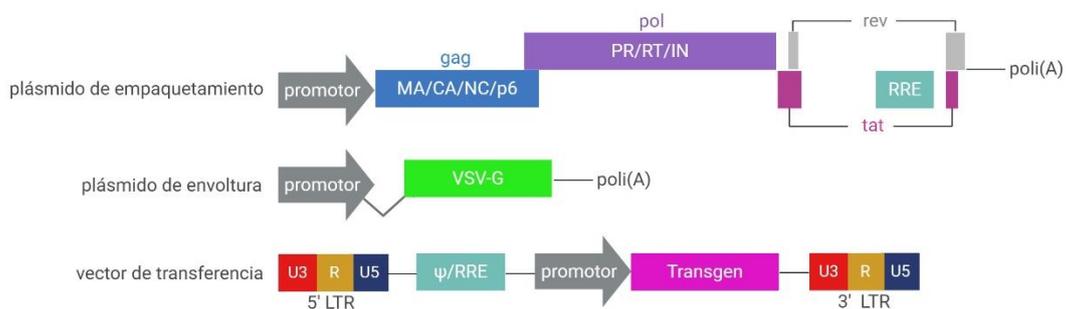


Fig. 11: Plásmidos del sistema de segunda generación de vectores lentivirales basado en HIV-1. Del plásmido de empaquetamiento han sido removidos los genes accesorios, o no esenciales, de HIV-1. El plásmido de envoltura, que codifica para la VSV-G, y el VT se mantienen igual que en la primera generación.

Con base en las modificaciones de seguridad realizadas, los vectores lentivirales de segunda generación pueden ser utilizados en laboratorios de bioseguridad nivel 2 (BL2)³³.

2.9.5 Sistema de Vectores Lentivirales de Tercera Generación basado en HIV-1

Para aumentar la bioseguridad del sistema de vectores, *rev* es separado y colocado en otro plásmido mientras que *tat* es removido por completo. Este sistema de vectores lentivirales consiste en un total de cuatro plásmidos: tres plásmidos auxiliares y un vector de transferencia (VT)⁴². La función de *tat* es sustituida utilizando una 5'-LTR modificada que contiene un promotor/enhancer fuerte derivado de RSV o CMV³³.

Adicionalmente a la incorporación de un cuarto vector, el sistema de tercera generación contempla un método de auto-inactivación presente en las LTRs del VT. Normalmente, los VL integran el casete del transgén flanqueado por LTRs en el genoma hospedero. En el caso de que el ciclo de replicación no termine ahí, sino que RCLs fuesen producidos a partir de la célula hospedera, estos pueden ser capaces de replicarse de una manera similar a aquellos que son tipo silvestre. Un problema adicional surge si las células infectadas con un vector son subsecuentemente infectadas por un lentivirus tipo silvestre. En este caso, el virus tipo silvestre puede actuar como ayudante para rescatar el vector integrado formando una nueva partícula viral diseminando la infección de manera vertical entre las células blanco. Además, debido a la actividad de enhancer y promotor que tienen las LTRs, existe el riesgo de la activación no deseada de los genes celulares adyacentes al sitio de integración por los LTRs de los vectores integrados. Si la integración del transgén ocurre cerca de un proto-oncogén, el LTR tendría el potencial de activar la transcripción de estos genes, ocasionando un problema mayor que encamina a la célula infectada al proceso de oncogénesis³⁰.

El mecanismo de auto-inactivación combate estos problemas. Las regiones LTRs que flanquean al VT están conformados por tres regiones: U3, R y U5. U3 actúa como enhancer y promotor viral mientras que R en el 3'-LTR contiene la señal de poliadenilación. Los elementos 5'U3 y 3'U5 no se encuentran presentes en el mRNA del provirus y durante la transcripción inversa del genoma, las delecciones de cada LTR son copiadas en la otra. Esta delección resulta en la inactivación transcripcional de los genomas virales que son insertados⁴⁹. El mecanismo de auto inactivación reduce cuatro probabilidades: 1) propagación de los virus recombinantes competentes en la replicación espontáneamente producidos; 2) activación por inserción de oncogenes celulares por la actividad promotora residual de los LTRs integrados; 3) movilización de los vectores integrados por un virus wild-type; 4) interferencia transcripcional y supresión de los LTRs³⁰.

Los cuatro plásmidos que integran este sistema son: 1) un vector de transferencia cuyas LTRs cuentan con un mecanismo de auto-inactivación; 2) un plásmido de empaquetamiento que cuenta solo con los genes *gag* y *pol* y con la

secuencia RRE; 3) un vector que contiene el gen *rev*; y 4) un plásmido de envoltura que codifica para la VSV-G (figura 12).

Como los elementos están separados en cuatro plásmidos, se requiere al menos de tres eventos de recombinación para generar un RCL. Incluso si estos ocurrieran, los virus resultantes solo tendrían *gag*, *pol* y *rev* de HIV-1, sin LTRs activas ni *tat* ni proteínas accesorias.

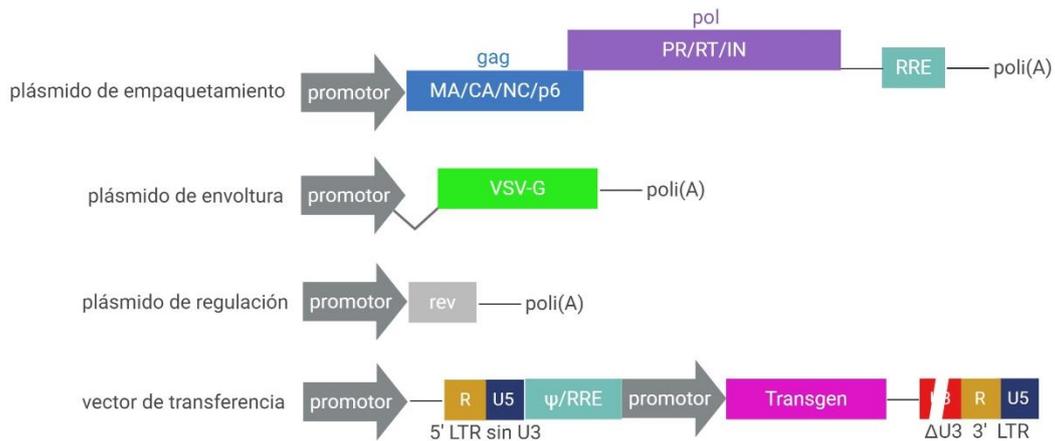


Fig. 12: Plásmidos del sistema de tercera generación de vectores lentivirales basado en HIV-1. El plásmido de empaquetamiento contiene únicamente los genes *gag* y *pol* y la secuencia RRE. El gen *rev* es separado en otro plásmido denominado “de regulación” y la función del gen *tat* es reemplazada por la delección de U3 en el 5’LTR y la introducción de un promotor en el vector de transferencia. El vector de transferencia presenta, además, la escisión de un segmento de la U3 en el 3’LTR como parte del mecanismo de auto inactivación (SIN por sus siglas en inglés). El plásmido de envoltura se mantiene igual que en las dos generaciones anteriores.

Con base en las modificaciones de seguridad, los vectores lentivirales de tercera generación pueden ser utilizados en laboratorios de bioseguridad nivel 2 (BL2)³³.

2.10 Producción de vectores lentivirales y líneas celulares de empaquetamiento

La producción de vectores lentivirales (VL) puede realizarse utilizando diferentes métodos de transfección en líneas celulares de empaquetamiento; ya sea utilizando sales de Calcio, lípidos catiónicos o electroporación⁵⁰. Las líneas celulares más comúnmente utilizadas para este propósito son las células 293T, derivadas de la línea celular de riñón humano embrionario HEK293 transformadas con el DNA del adenovirus humano tipo 5. La expresión del gen E1A de adenovirus en estas células permite la producción de altos niveles de proteínas virales al actuar como activador en trans de ciertos promotores. Las

células 293T, derivadas de las HEK293, se encuentran además transformadas con el antígeno T de SV40, la expresión de este antígeno está bajo el control del promotor de citomegalovirus humano y se da de manera constitutiva y a niveles altos⁵¹; la presencia de este antígeno permite la replicación episomal de los plásmidos transfectados que contengan el origen de replicación de SV40 y se ha relacionado con una mayor eficiencia en la producción de vectores⁵² lentivirales. La variedad 293FT utilizada en este trabajo muestra un crecimiento celular acelerado en comparación con las 293T. Otra línea celular utilizada para este propósito es la COS-1, estas tienen la ventaja de que reduce la presencia de proteínas celulares en las cosechas lentivirales sin embargo no pueden ser adaptadas a crecer en suspensión, únicamente crecen adheridas a la superficie, lo que las hace malas candidatas para la producción de VL a gran escala⁴².

A pequeña escala, la producción de VL se realiza en células adherentes que crecen en placas Petri, frascos T, sistemas multitray o frascos HYPERFlask. En cuanto estos sistemas, se ha reportado que probablemente debido a la gran disponibilidad de oxígeno, los dispositivos HYPERflask resultan ser más adecuados; ya que el título viral obtenido al utilizar estos dispositivos es más alto y el producto crudo se encuentra menos contaminado por proteínas celulares y ácidos nucleicos comparado con los sobrenadantes producidos en placas de cultivo tradicionales⁴². Independientemente del dispositivo de cultivo que se elija, cuando la confluencia es óptima, las células pueden ser transfectadas por cualquiera de los métodos mencionados. Uno de los agentes catiónicos de transfección más eficientes es la lipofectamina.

La mayoría de los lotes de VL destinados para la investigación son utilizados como concentrados y purificados^{42,50}. La optimización de las condiciones para la infección eficiente de los Lentivirus es de gran importancia para una gran variedad de aplicaciones de investigación. La optimización puede darse tomando en cuenta los diferentes factores que afectan la estabilidad y la capacidad de infección de los vectores lentivirales producidos.

Ha sido reportado que factores como el pH⁵³ y la adición de policationes⁵⁴ son factores que pueden incrementar la eficiencia de la infección mediadas por VL.

3 Justificación

El estudio de los mecanismos de regulación de la expresión de genes en las enfermedades metabólicas, como la osteoporosis, ha representado un gran reto para la investigación científica. El uso de modelos celulares y animales ha permitido el desarrollo de esta área de investigación, sin embargo, existen técnicas que deben ser mejoradas para el avance en el conocimiento de estos mecanismo.

Los vectores lentivirales han sido reportados como útiles para la transfección de células no divisibles, los diferentes sistemas diseñados para el uso seguro de estos mismos son muestra del interés que se tiene en ellos como herramienta tanto en el área de investigación como en la clínica. Por esta razón, estos vectores se contemplan como una alternativa para la sobreexpresión de microRNAs, particularmente el miR-1270, en el modelo de estudio de monocitos circulantes humanos.

No obstante, la producción de estos vectores es un procedimiento que, si bien se encuentra ampliamente descrito en la literatura; en la práctica ha resultado difícil de emular. De manera que se vuelve necesario la implementación de modificaciones a los protocolos inicialmente diseñados para realizar la producción hasta que se logre optimizar el método y el uso de vectores lentivirales se convierta en un práctica herramienta dentro del Laboratorio de Genómica del Metabolismo Óseo-INMEGEN.

El problema a enfrentar con la utilización de los vectores lentivirales es el hecho de que los monocitos no solo son precursores de osteoclastos, sino también de macrófagos. La diferenciación de monocitos a macrófagos puede darse por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos presentes en la superficie de los vectores lentivirales y, en caso de que la diferenciación ocurra antes de la infección, los VL serán eliminados. De ahí la necesidad de contar con un título viral lo suficientemente alto que obligue a los monocitos a infectarse en lugar de diferenciarse.

La generación de estos vectores virales permitirá el estudio de las funciones de los microRNAs, (particularmente el miR-1270) en el desarrollo de las alteraciones metabólicas relacionadas a la pérdida de la densidad mineral ósea. Diferentes

estudios han sido realizados, hasta el momento en líneas celulares humanas de osteosarcoma (SAOS y U2OS) y en la línea mielóide murina RAW 264.7. A pesar de que estas líneas celulares son buenos modelos de estudio, no son los que mejor pueden simular el curso real de la enfermedad. Idealmente se espera poder replicar los mismos experimentos de validación en monocitos circulantes humanos que sobre expresen el miR-1270 y que puedan posteriormente ser diferenciados a osteoclastos, evaluando el efecto que tiene este miR-1270 sobre sus genes blanco y, que se sabe, participan en la vía de diferenciación de osteoclastos.

4 Hipótesis

La producción de vectores lentivirales mediante co-transfecciones transitorias en células de empaquetamiento puede dividirse en tres fases: producción, cosecha, infección; donde pequeños cambios en cada uno de los procesos conducirá a diferentes resultados en el título viral de cada cosecha. Se espera que, realizando variaciones en parámetros como las cantidades de plásmido, los componentes del medio y el tiempo y forma de cosecha, se obtenga un protocolo optimizado para la producción de lentivirus con títulos óptimos para generar partículas infectivas suficientes para su uso en el laboratorio.

5 Objetivo general

Producir vectores lentivirales que sobre expresen el microRNA miR-1270, utilizando los sistemas de segunda y tercera generación (2G y 3G, respectivamente), en células 293FT

5.1 Objetivos particulares

- Clonar el miR-1270 en el plásmido pLenti6/V5-DEST™
- Realizar la producción de vectores lentivirales mediante cotransfecciones transitorias utilizando el método de lípidos catiónicos.
- Evaluar la eficiencia de la producción de vectores lentivirales.

- Evaluar la capacidad infectiva de los lentivirus producidos por infección de células 293FT con ayuda del gen reportero EmGFP (por sus siglas en inglés, *Emerald Green Fluorescent Protein* o Proteína verde fluorescente esmeralda).
- Encontrar las condiciones de almacenamiento que garanticen la integridad de los lentivirus y que además permitan su manejo en el laboratorio.
- Comparar la eficiencia de los sistemas de 2G y 3G.
- Optimizar el proceso de producción hasta obtener un título viral $>10^{12}$.

6 Diseño experimental

La figura 13 muestra de manera resumida la estrategia de trabajo diseñada para el cumplimiento de los objetivos.

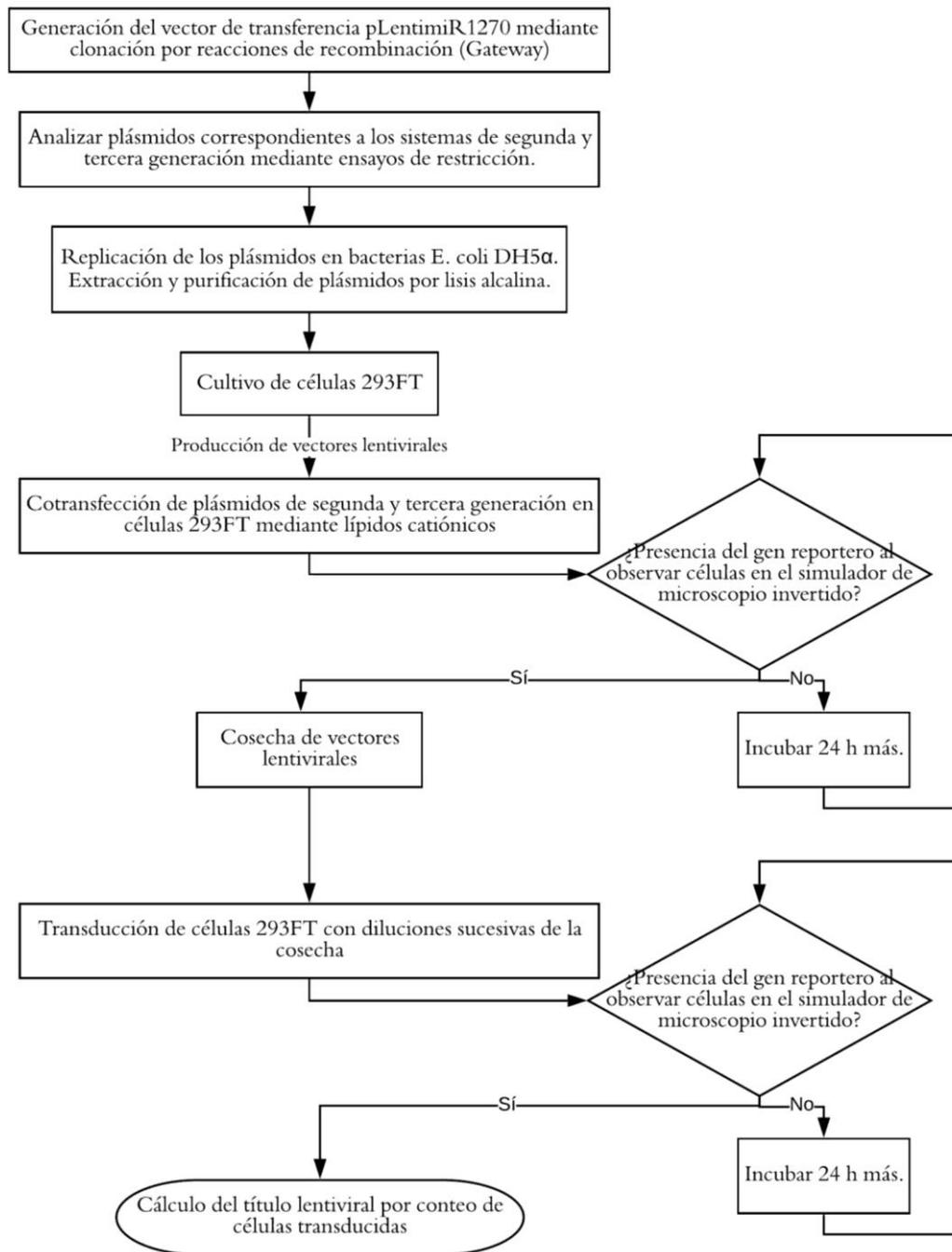


Fig. 13: Diseño experimental seguido para la producción de vectores lentivirales

7 Materiales y métodos

7.1 Cultivo de la línea celular 293FT

La línea celular 293FT (parte del kit *BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System with EmGFP*. Invitrogen, Thermo Fisher. Cat. K4938-00) se encontraba alicuotada y conservada a -70°C . Se descongelaron dos alícuotas a

partir de pase uno y se sembraron por separado en placas de p100 con 10 ml de medio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*. Gibco™. Cat. 12100-046. Lote 1776549) adicionado con suero fetal bovino (SFB) al 10% (*Fetal bovine serum. Heat inactivated*. Biowest. Cat. S165H-500. Lote S16454S165H) y penicilina-estreptomicina (Pen Strep, 10000 U/L penicilina y 10000 µg/ml estreptomicina. *Pen Strep*. Gibco™. Cat. 15140-122. Lote 2029636) (DMEM^x). Las células se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂.

A las células se les realizaba cambio de medio cada cuatro días y se tripsinizaban (*0.5% Trypsin-EDTA Solution*. Gibco™. Cat. 15400-054. Lote 1798316) y dividían de una a dos veces por semana según la planeación de los experimentos y/o las condiciones de las placas. Se consideraba necesario un cambio de placa cuando la confluencia de células era del 90%. Se añadía una unidad al número de pases cada que las células eran tripsinizadas y sembradas en una nueva superficie. Al llegar al pase 35, las células se desechaban y se descongelaba un vial con un número de pase menor.

7.2 Construcción del plásmido de transferencia pLentimiR-1270

El plásmido de transferencia utilizado para ambos sistemas se construyó siguiendo el protocolo descrito en los manuales *BLOCK-iT™ Pol II miR RNAi Expression Vector* y *BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System* (ambos contenidos en el *BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System kit*). El procedimiento de construcción se detalla a continuación.

7.2.1 Diseño y síntesis del oligo de doble cadena

El primer paso para la construcción del vector de transferencia (VT) es el diseño y síntesis de dos oligonucleótidos: uno de ellos, el oligonucleótido sentido, contiene la secuencia del pre-miRNA de interés y el otro, el oligonucleótido antisentido, es su complementario. Además, el oligo sentido contiene tres secuencias (dos a los flancos y otra intermedia) del miR155 de ratón (las cuales confieren estabilidad a la estructura secundaria del pre-miR) así como una

no permitir que la suspensión se caliente, de lo contrario podría darse la separación y la formación de estructuras secundarias en los oligos de cadena sencilla.

En la figura 14 es posible observar que la reacción de alineación deja cuatro nucleótidos libres en ambos extremos del ds-oligo miR-1270; estos tienen complementariedad con los extremos del vector pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR contenido en el kit el cual se encuentra linealizado. Es posible entonces, realizar una reacción de ligación entre el ds-oligo miR-1270 y el vector linealizado para obtener un nuevo vector denominado pcDNAmiR-1270 que además contendrá el marco de lectura abierto para la proteína EmGFP.

7.2.2 Formación del pcDNAmiR-1270

La reacción de ligación entre el pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR y el ds-oligo es mediada por una enzima T4 DNA ligasa que se encuentra en el mismo kit. Esta enzima es capaz de realizar la ligación a temperatura ambiente en cinco minutos. Para este propósito, fue necesario realizar una dilución 1:5000 de la suspensión de ds-oligo (es decir, llevarlo a una concentración final de 2 nM) obtenida en el paso anterior. Los componentes de esta reacción se encuentran enlistados en la tabla 3.

Tabla 3. Componentes de la mezcla de reacción para la ligación pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR-ds-oligo miR-1270

Reactivo	Concentración	Volumen
Amortiguador de ligación 5x	1x	4 µl
pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR	0.5 ng/µl	2 µl
ds-oligo miR-1270 (10nM)	2 nM	4 µl
Agua Milli-Q	-	9 µl
T4 DNA ligasa (1 U/µl)	-	1 µl
Volumen final		20

Con 2 µl del producto de ligación se transformaron en bacterias quimiocompetentes *E. coli* One Shot® TOP10 (*BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System kit*) por choque térmico. El vector pcDNA™ 6.2-GW/EmGFP-miR contiene un casete de resistencia a espectinomicina de

manera que este antibiótico fue usado como agente de selección de bacterias transformadas. El protocolo de transformación utilizado se encuentra en el ANEXO 1.

Un inóculo de las bacterias transformadas crecidas en placa se sembró en medio Luria Bertani (LB, *Luria Broth Base*. Invitrogen. Cat. 12795-027. Lote 160826012008) con Espectinomicina 50 µg/ml para la replicación del plásmido; este se extrajo por lisis alcalina y se purificó por columnas de matriz de sílice (*Plasmid Midi kit*. Qiagen. Cat. 12143. Lote 154014884) mediante el protocolo del ANEXO 2.

El vector obtenido es compatible con la tecnología Gateway®, de manera que el casete de expresión del miR-1270 puede ser transferido a un vector destino. De acuerdo con el propósito de este trabajo, el vector destino utilizado fue el pLenti6/V5-DEST™ (dentro del *BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System kit*); este último está diseñado para fungir como el vector de transferencia dentro de un sistema de vectores lentivirales.

7.2.3 Reacciones de recombinación BP/LR

Para la migración del casete de expresión al vector pLenti6/V5-DEST™ es necesario generar una clona de entrada attL producto de la recombinación entre los sitios attB presentes en la clona de expresión (pcDNAmiR-1270) y los sitios attP presentes en un vector donador (pDONR™221). Posteriormente la clona de entrada attL se recombina con los sitios attR presentes en el vector destino pLenti6/V5-DEST™ para generar nuevamente una clona de expresión attB contenida en un nuevo vector denominado vector de transferencia.

El primer paso para la generación de la clona de entrada es linealizar el pcDNAmiR-1270 utilizando alguna enzima de restricción cuyo sitio de corte se encuentre fuera del casete de expresión. En este caso, se utilizó la enzima SpeI (NEB. Cat. R01335. Lote 0321402), la mezcla de reacción se incubó a 37°C por 1 hora; se digirieron 5 µg de pcDNAmiR-1270 y se purificaron en columnas de matriz de sílice (*MinElute® Reaction Cleanup kit*. Qiagen. Cat. 28204. Lote 133201457) de acuerdo con lo descrito en la tabla 4.

Tabla 4. Componentes de la mezcla de reacción para la digestión del pcDNAmiR-1270

Componente	Concentración	Volumen
CutSmart® Amortiguador 10x (NEB. Cat. B7204S. Lote 1891606)	1x	5 µl
SpeI 10,000 U/ml (NEB. Cat. R01335. Lote 0321402)	1 U/µg DNA	0.5 µl
DNA 1 µg/µl	100 ng/µl	5 µl
Agua Milli-Q	-	39.5 µl
	Volumen final	50 µl

La reacción de digestión se limpió mediante columnas de gel de sílice, protocolo descrito en el ANEXO 3.

La reacción de recombinación BP entre la clona de expresión linealizada y el vector donador es mediada por una mezcla enzimática denominada Clonasa BP (contiene las enzimas Int e IHF); para ello, se preparó la siguiente mezcla de reacción mostrada en la tabla 5.

Tabla 5. Componentes de la reacción BP

Componente	Volumen
pcDNAmiR-1270 (168 ng/µl)	1 µl
pDONR™221 (150 ng/µl)	1 µl
Agua Milli-Q	6 µl
Clonasa BP	2 µl
Volumen final	10 µl

La mezcla se incubó por 1 hora a 25°C y posteriormente 3 µl del producto de esta reacción (la clona de entrada) se utilizaron para llevar a cabo la reacción de recombinación LR.

La reacción de recombinación LR entre la clona de entrada y el vector destino es mediada por una enzima denominada Clonasa LR; para ello, se preparó la mezcla de reacción de la tabla 6.

Tabla 6. Componentes de la reacción LR

Componente	Volumen
Clona de entrada	3 µl
pLenti6/V5-DEST™	1 µl

Agua Milli-Q	4 μ l
Clonasa LR	2 μ l
Volumen final	10 μ l

La mezcla de reacción se incubó a 25°C toda la noche. Al día siguiente se añadió 1 μ l de proteinasa K y se incubó a 37°C por 1 hora.

Se transformaron, con el producto de esta reacción (el pLentimiR-1270), bacterias quimiocompetentes *E. coli* One Shot® Stbl3™. El vector pLenti6/V5-DEST™ contiene un casete de resistencia a ampicilina, lo cual permitió usar este antibiótico como agente de selección de bacterias transformadas. El protocolo de esta transformación se describe en el ANEXO 4.

7.2.4 Extracción y análisis de DNA plasmídico de las clonas de pLentimiR-1270

Para comprobar la presencia del plásmido en las bacterias transformadas se seleccionaron siete colonias individuales de la placa con ampicilina y se tomó un inóculo de cada una de ellas, el cual se sembró en tubos con 5 ml de medio LB con ampicilina 100 μ g/ml. De estos pequeños cultivos se extrajo plásmido por el método de lisis alcalina sin utilizar ningún estuche comercial. El protocolo de extracción y purificación se describe en el ANEXO 5.

Los plásmidos obtenidos de las mini prep se analizaron en un gel de agarosa al 1% para corroborar la presencia e integridad del plásmido. De aquellas clonas que tenían el plásmido, se seleccionaron 3 para realizar un ensayo de transfección por el método de lípidos catiónicos utilizando el reactivo Lipofectamine®2000 (Invitrogen. Cat. 11668-079. Lote 1815588) en células 293.FT. Cabe destacar que el casete de expresión del miR-1270 migrado del pcDNAmiR-1270 hasta el pLentimiR-1270 por las reacciones de recombinación BP/LR contiene la secuencia codificante para la proteína verde esmeralda fluorescente (EmGFP, por sus siglas en inglés); hecho que se aprovechó para la identificación del pLentimiR-1270 (figura 15) en este ensayo de transfección. El protocolo de transfección se describe en el ANEXO 6.

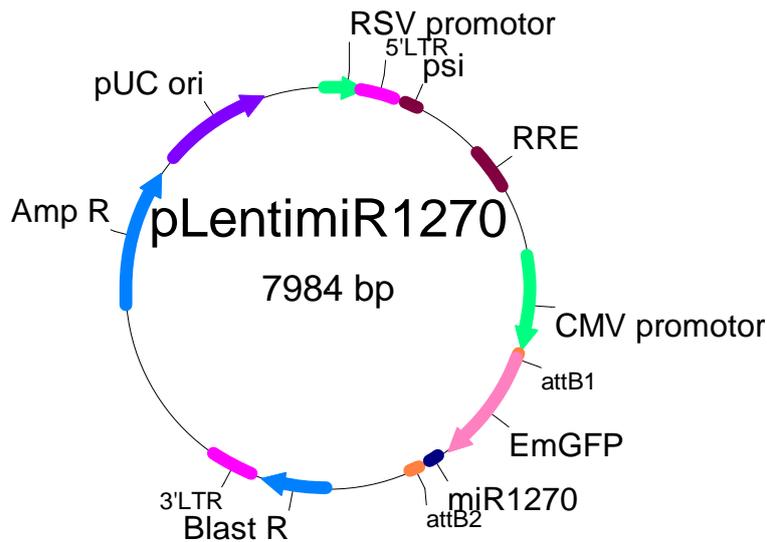


Fig. 15: Esquema del pLentimiR-1270. Se muestra el casete de expresión del miR-1270 proveniente del pcDNAmiR-1270 que va desde el sitio attB1 hasta el attB2 (en naranja). Creado en el software A Plasmid Editor, ApE.

Después de observar las células transfectadas al EVOS™, se seleccionó una de las tres clonas probadas del pLentimiR-1270. A partir de esta, se inocularon 200 ml de medio LB con ampicilina con el primocultivo bacteriano correspondiente a las clonas seleccionadas para la extracción de plásmido por el método de lisis alcalina y purificación por columnas de matriz de sílice (*Plasmid Midi kit*. Qiagen. Cat. 12143.Lote 154014884).

7.3 Plásmidos de empaquetamiento. Sistemas de segunda y tercera generación

Se contaba con cinco plásmidos de empaquetamiento y con un solo plásmido de transferencia para conformar los sistemas de segunda y tercera generación. De los cinco plásmidos de empaquetamiento dos corresponden al sistema de segunda generación y tres corresponden al sistema de tercera generación; estos son: psPAX2, pMD2.G (*Addgene plasmids*. No. 12260 y 12259), y pLP1, pLP2, pLP-VSVG (*ViraPower™ Bsd Lentiviral Support Kit*. Invitrogen, Thermo Fisher, dentro del *BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR-RNAi Expression System with EmGFP*. Cat. K4938-00). El plásmido de transferencia para ambos sistemas es el pLentimiR-1270 (construido con ayuda del *BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR*

RNAi Expression System with EmGFP. Invitrogen, Thermo Fisher. Cat. K4938-00).

De esta manera, el sistema de segunda generación se conforma por tres plásmidos y el de tercera generación por cuatro. En la tabla 7 se muestra la distribución de los plásmidos en ambos sistemas; así como las secuencias más importantes que contiene cada uno; por otro lado, la figura 16 muestra el esquema de cada uno de los plásmidos de empaquetamiento; el vector de transferencia se esquematiza en la figura 15 en la sección anterior.

Tabla 7. Conformación de los sistemas de segunda y tercera generación

Sistema	Plásmido	Secuencias	Función
Segunda Generación	pLenti-miR-1270	miR-1270/GFP	Vector de transferencia
	psPAX2	gag/pol/tat/rev	Proteínas estructurales y no estructurales Genes reguladores
	pMD2.G	VSV-G	Glicoproteína de envoltura
Tercera Generación	pLenti-miR-1270	miR-1270/GFP	Vector de transferencia
	pLP1	gag/pol	Proteínas estructurales y no estructurales
	pLP2	rev	Gen regulador
	pLP-VSVG	VSV-G	Glicoproteína de envoltura

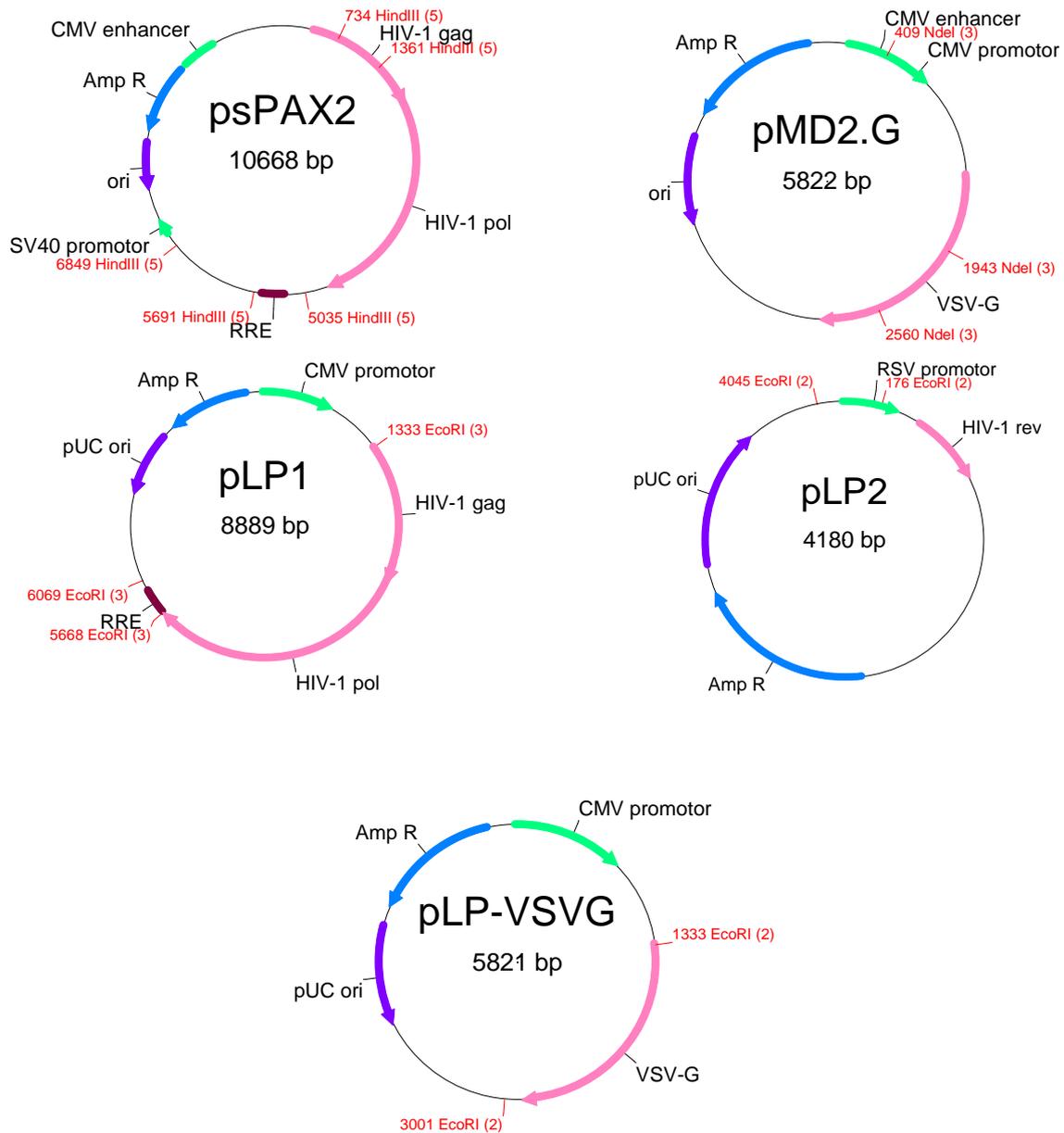


Fig. 16: Diagrama de los cinco plásmidos de empaquetamiento utilizados en los sistemas de segunda y tercera generación. *psPAX2*: origen de replicación en procariontes, promotor SV40, enhancer CMV, gen resistencia a ampicilina, gen gag de HIV-1, gen pol de HIV-1, secuencia RRE de HIV-1, cinco sitios de corte para la enzima HindIII. *pMD2.G*: origen de replicación en procariontes, gen resistencia a ampicilina, promotor CMV, enhancer CMV, gen VSV-G de VSV, tres sitios de corte para la enzima NdeI. *pLP1*: origen de replicación en procariontes pUC, gen resistencia a ampicilina, promotor CMV, gen gag de HIV-1, gen pol de HIV-1, secuencia RRE de HIV-1, tres sitios de corte para la enzima EcoRI. *pLP2*: origen de replicación en procariontes pUC, gen resistencia a ampicilina, promotor RSV, gen rev de HIV-1, dos sitios de corte para la enzima EcoRI. *pLP-VSVG*: origen de replicación en procariontes pUC, gen resistencia a ampicilina, promotor CMV, gen VSV-G de VSV, dos sitios de corte para la enzima EcoRI. Elaborados con ayuda del software A Plasmid Editor, ApE.

7.4 Ensayos de restricción para la identificación de los plásmidos de empaquetamiento

Cada uno de los plásmidos se digirió con alguna enzima de restricción cuyo sitio de corte estuviera presente al menos dos veces dentro de la secuencia del plásmido de manera que pudieran ser identificados por el patrón de bandeo obtenido al realizar una electroforesis de las digestiones en geles de agarosa al 1% (*UltraPure™ Agarose*. Invitrogen, Thermo Fisher. Ref. 16500-500. Lote 0000497140) utilizando amortiguador TAE 1x como amortiguador de corrida.

La tabla 8 contiene la enzima de restricción utilizada para digerir cada vector de empaquetamiento, así como el amortiguador en el que se realizó la reacción de acuerdo con lo establecido en el inserto de cada enzima.

Tabla 8. Enzimas de restricción utilizadas para la digestión de los plásmidos de empaquetamiento.

Plásmido	Cantidad DNA	Enzima	Amortiguador
psPAX2	10 µg	HindIII 100,000 U/ml (NEB. Cat. R0104T. Lote 0701312)	<i>NEAmortiguador™ 2.1</i> (NEB. Cat. B7202S. Lote 0011310)
pMD2.G	10 µg	NdeI 20,000 U/ml (NEB. Cat. Lote)	<i>CutSmart® Amortiguador 10x</i> (NEB. Cat. B7204S. Lote 1891606)
pLP1	10 µg	EcoRI 20,000 U/ml (NEB. Cat. R0101L. Lote 0341510)	<i>NEAmortiguador™ EcoRI 10x</i> (NEB. Cat. B0101S. Lote 0081505)
pLP2	10 µg	EcoRI 20,000 U/ml	<i>NEAmortiguador™ EcoRI 10x</i>
pLP-VSVG	10 µg	EcoRI 20,000 U/ml	<i>NEAmortiguador™ EcoRI 10x</i>

Las reacciones de digestión se prepararon conforme a las cantidades descritas en la tabla 9 utilizando el plásmido y la enzima según corresponda. Las reacciones se incubaron a 37°C por tres horas.

Tabla 9. Componentes de la reacción de digestión general realizada para cada plásmido

Componente	Concentración	Volumen
Amortiguador 10x	1x	5 µl
Enzima	-	0.5 µl
DNA 1 µg/µl	-	10 µl
Agua Milli-Q	-	34.5 µl
Volumen final		50 µl

La figura 17 muestra el patrón de bandeo obtenido para cada plásmido según el número de sitios de corte de la enzima utilizada dentro de la secuencia del vector.

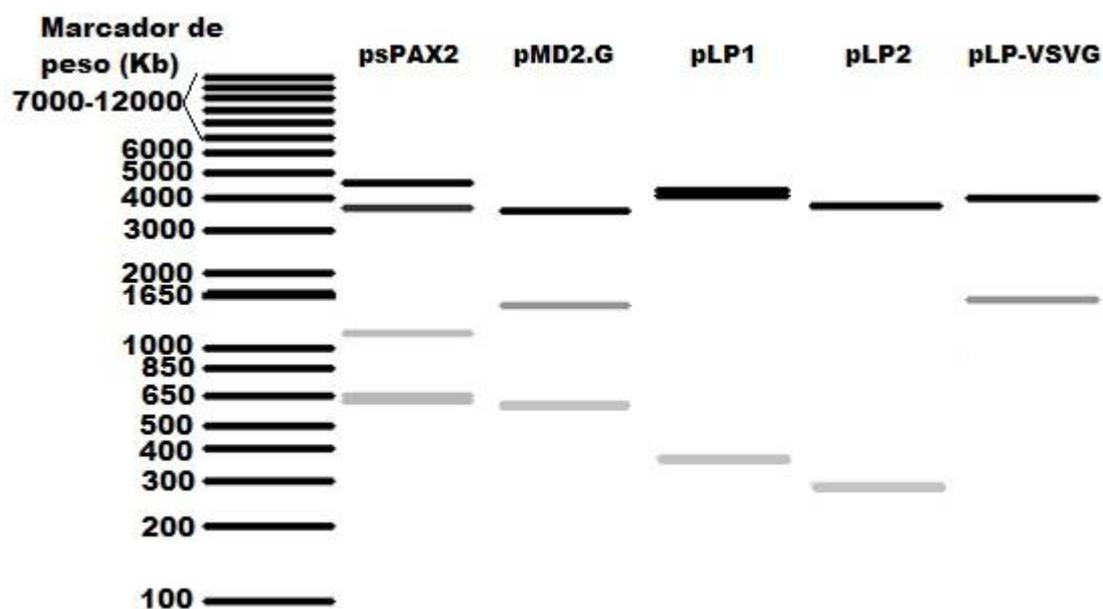


Fig. 17: patrón de bandeo esperado de la digestión de cada plásmido con la enzima correspondiente. El tamaño de las bandas, en Kb, es el siguiente: psPAX2, 627, 656, 1158, 3674 y 4553; pMD2.G, 617, 1534 y 3671; pLP1, 401, 4153 y 4335; pLP2, 311 y 3869; pLP-VSVG, 1668 y 4153. Elaborado con ayuda del software A Plasmid Editor, ApE.

7.5 Replicación de plásmidos en bacterias

Se tenían cepas de *E. coli* DH5α transformadas con cada uno de los plásmidos, tanto de empaquetamiento como con el vector de transferencia, conservadas en glicerol a -70°C. Un pequeño inóculo se sembró en medio LB con ampicilina (100 µg/ml), se incubó toda la noche a 37°C con agitación constante y al día siguiente se realizó la extracción y purificación del plásmido correspondiente (*Plasmid Midi kit*. Qiagen. Cat. 12143.Lote 154014884). Este procedimiento se realizaba cada

que era necesario; es decir cuando la cantidad del plásmido en cuestión menguaba.

7.6 Producción de vectores lentivirales

El proceso de producción de vectores lentivirales puede dividirse en 3 etapas: co-transfección con vectores de sistemas de segunda y tercera generación, cosecha e infección para el cálculo del título viral. El protocolo base seguido para realizar cada una de estas etapas fue sometido a modificaciones con la finalidad de mejorar el título viral. Se probaron los sistemas de segunda y tercera generación purificados y cuantificados de manera previa utilizando el equipo Nanodrop para una cuantificación rápida. Los experimentos de ambas generaciones se llevan a cabo a la par en eventos individuales de co-transfección, cosecha e infección.

La producción de vectores lentivirales se realizó mediante co-transfecciones transitorias en células 293FT utilizando la técnica de lípidos catiónicos utilizando el reactivo Lipofectamine® 2000 (*Lipofectamine® 2000 Reagent*. Invitrogen, Thermo Fisher. Ref. 11668-019. Lote 1815588).

En un primer paso se cuentan las células que serán sembradas en las placas de transfección esperando que la confluencia de células el día de la transfección sea aproximadamente 70-80%. Se prepara la mezcla de transfección con el DNA que se quiere insertar dentro de las células (plásmidos de segunda y tercera generación en eventos separados) y el reactivo Lipofectamine® 2000 en un medio mínimo Opti-MEM® donde se permite la formación de estructuras de carácter lipídico que envuelven aleatoriamente moléculas de DNA plasmídico. Posteriormente la mezcla de transfección se incuba por 6 horas con las células 293FT y se realiza el cambio del medio de transfección por medio alto en glucosa fresco y suplementado. Las células que hayan tomado al menos una copia de cada uno de los plásmidos necesarios (tres plásmidos diferentes para el sistema de segunda generación y cuatro para el sistema de tercera generación) para formar un virión funcional en un primer ciclo de infección comenzarán la producción de partículas retrovirales las cuales serán liberadas al medio. Al observar las placas de células transfectadas al EVOS™ se busca la presencia

de indicadores positivos de la producción de vectores lentivirales como el efecto citopático en las 293FT caracterizado por la formación de sincitios; células gigantes multinucleadas resultado de la fusión de varias células normales. Así como la expresión de la EmGFP codificada por el VT.

Pasado el tiempo de producción, el sobrenadante donde se acumulan las partículas virales es cosechado de las placas transfectadas y almacenado para su conservación. Al ser virus envueltos, los vectores lentivirales son sensibles a la temperatura, cambios de pH y concentración de sales. Es necesario que la cosecha se mantenga todo el tiempo a temperatura de 4°C para su uso a corto plazo y a -70°C para su conservación a largo plazo. De preferencia, una vez descongelados, los Lentivirus no deben ser congelados nuevamente. El protocolo de cosecha también sufrió derivaciones que incluyen el filtrado del sobrenadante y la concentración por centrifugación.

Como último paso fue necesario probar la funcionalidad de los VL para infectar células nuevas y así mismo realizar el cálculo del título viral.

7.6.1 Co-transfección transitoria con plásmidos de segunda y tercera generación.

La optimización del protocolo de producción de vectores lentivirales comenzó en este paso. Para ello, inicialmente se probaron las cantidades de cada plásmido y la proporción lipofectamina:DNA necesarias para obtener un 80% de células 293FT transfectadas. Se tomo como indicador positivo de la transfección la expresión de la proteína EmGFP la cual es posible visualizar en un arreglo perinuclear dentro de las células 293FT que adquieren el vector de transferencia (pLentimiR1270). El protocolo inicial de co-transfección se expone en el ANEXO 7. Las cantidades de cada plásmido utilizadas se encuentran en la tabla 10.

Tabla 10. Cantidades de plásmidos iniciales para cada sistema. Protocolo de co-transfección.

Tubo	Plásmido	Cantidad de plásmido	Cantidad Lipofectamina
Sistema de Segunda Generación			
A	pLenti-miR1270	5 µg	
	psPAX2	1 µg	
	pMD2.G	0.5 µg	
B			19.5 µL
Sistema de Tercera Generación			
A	pLenti-miR1270	2.5 µg	
	pLP1	2 µg	
	pLP2	1.5 µg	
	pLP-VSVG	1 µg	
B			21 µL

El gen reportero, junto con la observación de sincitios, son indicadores positivos de la producción lentiviral; sin embargo, la cosecha no se realiza sino hasta pasadas 72 horas de la co-transfección. Durante estas horas de incubación, las células se monitorean cada 24 horas; ya que muchas de ellas comienzan a morir y despegarse, sea por efecto citopático mediado por los Lentivirus o por falta de nutrientes y/o exceso de metabolitos que acidifican el medio. Si no es posible mantener las células hasta las 72 horas, cosechar en cuanto la situación sea crítica. Considerar que la acidez en el medio afecta la integridad de las partículas lentivirales que se encuentren en suspensión.

7.6.2 Cosecha de vectores lentivirales

Durante la cosecha de vectores lentivirales se debe cuidar en todo momento la bioseguridad; a pesar de que los vectores lentivirales utilizados han sufrido modificaciones genéticas para aumentar la seguridad en el laboratorio; las partículas virales resultantes deben trabajarse en laboratorios de nivel de seguridad 2⁵⁶. Adicional a esto, cada material desechable que toque el medio de cultivo con partículas virales debe ser colocado en un recipiente con hipoclorito de sodio al 5% a manera de inactivar las partículas lentivirales existentes en estos. Posteriormente, los materiales se desechan en un bote designado para Residuos Potencialmente Biológico-Infeciosos (RPBI). El material no

desechable que se utiliza para trabajar con estos agentes debe ser de uso exclusivo para el área de cultivo y se desinfecta tras cada sesión de trabajo. El pipeteo con las micropipetas se realiza de manera correcta evitando que el líquido entre en cualquier momento al sistema mecánico de estos instrumentos, como protección adicional se usan puntas con filtro. Cuando se use cualquier instrumento para tomar líquido se evita salpicar las paredes o superficie de la campana. Las demás prácticas de bioseguridad en el laboratorio se siguen como en cualquier otro experimento.

El protocolo de cosecha de vectores lentivirales inicial se describe en el ANEXO 8.

7.6.3 Infección de células 293FT

Para realizar este procedimiento se siembran, en el día cero, células 293FT en cantidad aproximada de 175,000 células por pozo en una placa de 12 pozos para cada sistema. Estas células se incuban en medio DMEM^x fresco toda la noche en condiciones normales (37°C, 5% CO₂). Al día siguiente, puede realizarse el protocolo si la capacidad de la placa es aproximadamente del 80%. Para la realización del protocolo de infección, al igual que en la cosecha, deben seguirse las reglas de bioseguridad establecidas para agentes de nivel de bioseguridad II. El protocolo de infección se describe en el ANEXO 9.

7.7 Concentración de las cosechas de vectores lentivirales por ultracentrifugación

La concentración de las cosechas se realizó utilizando todas las alícuotas pertenecientes a ensayos de infección positivos. Los pasos seguidos para la realización de este protocolo se detallan en el ANEXO 10.

7.8 Cálculo del título lentiviral

El título lentiviral se expresa en unidades de infección por ml (TU/ml). Para ello se utiliza una fórmula que contempla la frecuencia de células que expresan el marcador EmGFP, el total de células en la placa al momento de la infección, el volumen de inóculo y la dilución utilizada.

$$\text{Título lentiviral} = \left[Fx \frac{C}{V} \right] x D$$

donde:

F = Frecuencia de células EmGFP positivas (porcentaje obtenido entre 100)

C = Número total de células al momento de la transducción

V = Volumen de inóculo en ml

D = Dilución lentiviral

La manera más precisa de realizar este cálculo se obtiene mediante el uso de la técnica de citometría de flujo para el conteo tanto de células EmGFP positivas como de células totales. Sin embargo, al no contarse con la técnica en el laboratorio, se optó por realizar un cálculo al microscopio considerando para un mismo campo, las células totales visualizadas y aquellas que expresan la EmGFP bajo el filtro del EVOS. De esta manera se obtendría un título aproximado.

8 Resultados

8.1 Cultivo de la línea celular 293FT

Las células 293FT fueron utilizadas como hospederas para la producción de vectores lentivirales. Esta línea celular es derivada de células humanas embrionarias de riñón (HEK por sus siglas en inglés). Son células adherentes; es decir crecen en monocapa sobre una superficie. La figura 18 muestra la morfología habitual de estas células cuando no han sufrido ningún tratamiento. Las células se mantuvieron en condiciones de temperatura controlada a 37°C y una atmosfera de 5% de CO₂, en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, por sus siglas en inglés) adicionado con 10% de suero fetal bovino.

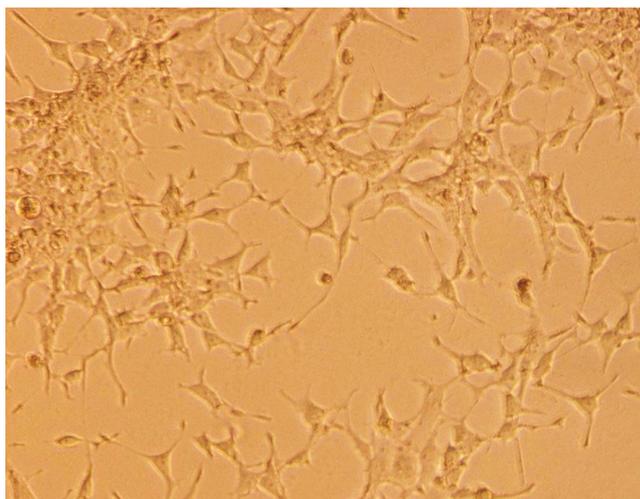


Fig. 18: Células 293FT al microscopio. Morfología y tamaño normal de las células 293FT cuando no hay sido sometidas a ningún tratamiento. Aumento 10x.

8.2 Producción de vectores lentivirales (VL) en la línea celular de empaquetamiento 293FT.

8.2.1 Obtención del pLentimiR-1270

La construcción del vector de transferencia, el pLentimiR-1270, se realizó a través del sistema de vectores de expresión Gateway®. Estructuralmente, el oligonucleótido diseñado contiene la secuencia sobresaliente de la hebra sentido, seguido de la secuencia anti-sentido de interés (el miR-1270 maduro) de 23 nucleótidos. Continúa con un espacio de 19 nucleótidos que formará el bucle terminal del pri-miRNA seguido de la secuencia sentido de interés con dos nucleótidos eliminados (figura 15). Durante el procesamiento de esta secuencia, se formará una estructura secundaria que es estable. En la reacción de alineación de los oligos no se ve involucrada ninguna enzima; en el momento en que se han mezclado ambos oligos en partes iguales, la mezcla se lleva a 95°C, temperatura a la que las posibles estructuras secundarias formadas por cada hebra se eliminan, quedando linealizadas. Posteriormente se permite la lenta disminución de la temperatura provocando que las hebras se unan por complementariedad, tal como se muestra en la figura 19.

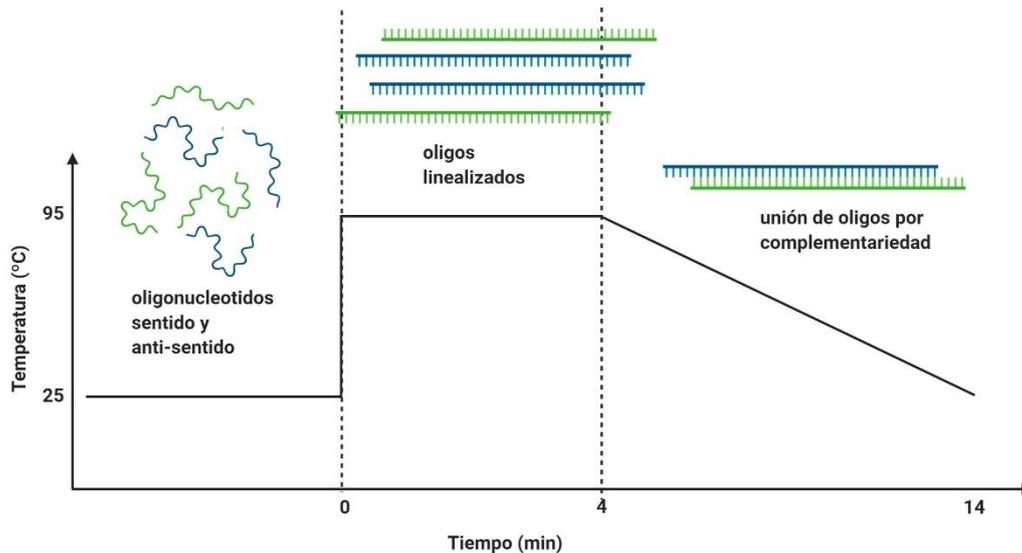


Fig. 19: Formación del ds oligo. La mezcla equimolar de los oligos sentido y anti-sentido en suspensión se incuba a 95°C por 4 minutos permitiendo la eliminación de posibles estructuras secundarias y dejando a los oligos linealizados. Posteriormente se permite el descenso lento de temperatura por 10 minutos, en este tiempo los oligos se alinean y se unen por complementariedad para formar un oligo de doble cadena con cuatro nucleótidos excedentes en cada extremo.

El oligonucleótido de doble cadena (ds oligo) formado tras la alineación tiene, en cada uno de los extremos, secuencias complementarias al vector pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR contenido en el mismo kit el cual se encuentra linealizado. De esta manera, la unión entre el ds oligo y el vector puede ser mediada por la enzima T4 ligasa generándose en este paso, un vector denominado pcDNA™6.2-GW/EmGFP-miR-1270 (pcDNAmiR-1270). El vector pcDNA es considerado la clona de entrada que es utilizada en el siguiente paso para la migración del casete de expresión (secuencia del miR-1270 y gen reportero EmGFP) hacia un vector donador.

Como siguiente paso, se utilizaron las enzimas provenientes del fago λ para la migración del casete de expresión; esto es posible gracias a que el vector pcDNA resultante cuenta con sitios attB (attB1 y attB2) que permiten la recombinación con un vector donador pDONR™221 con sitios attP (attP1 y attP2) para dar lugar a una clona de entrada con sitios attL (attL1 y attL2). Para comenzar con la clonación del casete de expresión es necesario linealizar el vector pcDNAmiR-1270 utilizando una enzima que no tenga sitio de corte dentro del casete; la enzima seleccionada fue la Spel cuyo sitio de corte se ilustra en el mapa del pcDNAmiR1270 (Figura 20).

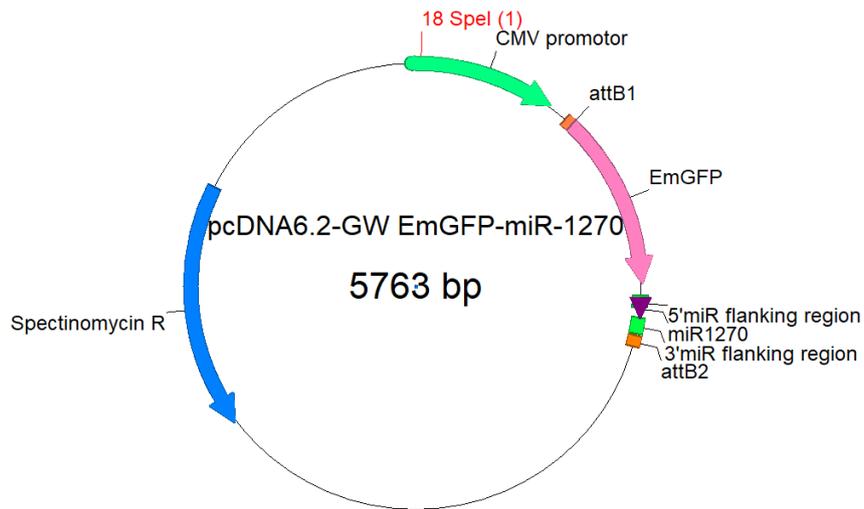


Fig. 20: Esquema del vector *pcDNA6.2-GW/EmGFP-miR-1270*. El sitio de corte de la enzima *SpeI* se encuentra fuera del casete de expresión delimitado por los sitios de recombinación *attB1* y *attB2*. El casete de expresión contiene el gen reportero *EmGFP* y el *miR-1270* proveniente del ds oligo.

Al tener la clona de expresión linealizada es posible realizar la recombinación entre los sitios *attB* y *attP*; reacción mediada por las enzimas presentes en la mezcla Clonasa BP™, la cual contiene la Integrasa (Int) y el Factor de Integración del Hospedero (IHF) del fago λ. Estas dos proteínas se unen a la región central del sitio *attP* y posteriormente a la misma región presente en el sitio *attB*, acción que es posible gracias a la homología en 7 pares de bases que presentan ambos sitios. La unión del complejo enzimático libera extremos cohesivos en ambos sitios conllevando a la formación de un hetero dúplex que se resuelve dejando una clona de entrada en el vector donador con sitios *attL*. La figura 21 muestra el esquema del vector *pDONR™221* utilizado para la reacción BP y el vector *pLenti6/V5-DEST* utilizado para la reacción LR.

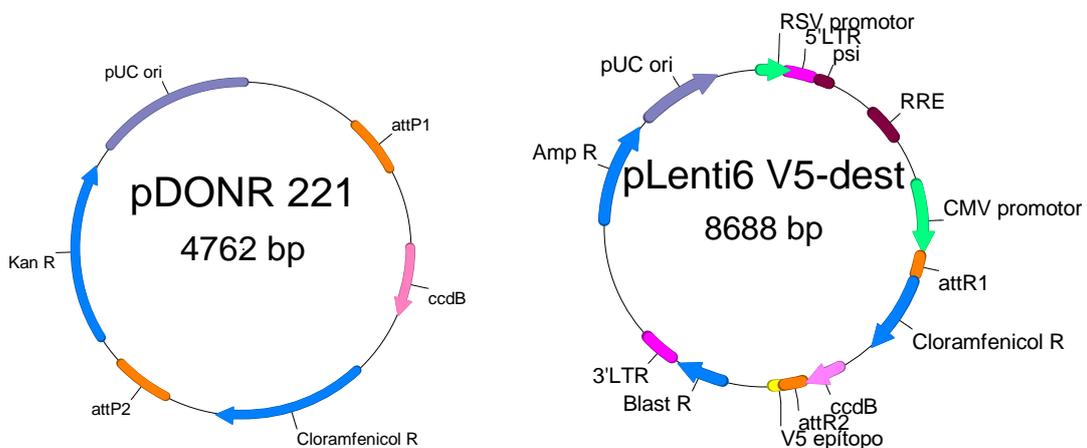


Fig. 21: Esquema de los vectores pDONR™221 y pLenti6/V5-Dest™. Ambos cuentan con los genes de selección *ccdB* y resistencia a Cloranfenicol dentro de los sitios de recombinación (*attP* y *attR* respectivamente) y difieren en el gen de resistencia encontrado fuera de esta región; mientras que el de la izquierda contiene el gen de resistencia a Kanamicina, el de la derecha confiere resistencia a Ampicilina.

El producto de la reacción de recombinación LR es nuevamente una clona de expresión contenida en un vector denominado destino, el cual se selecciona dependiendo del tipo de análisis que se quiera realizar con él. Para fines de este trabajo, el vector destino más adecuado fue el pLenti6/V5-DEST contenido en el *BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System kit*. Este vector cuenta con los sitios *attR* recombinables con la clona de entrada; además, puede ser utilizado como vector de transferencia (VT) en dentro de un sistema de expresión lentiviral.

Al finalizar la reacción LR, se añade a la mezcla la proteinasa K con el objetivo de inactivar las enzimas presentes en ella. El vector resultante es denominado pLentimiR-1270 y su diagrama se expone en la figura 22. El pLenti-miR-1270 es utilizado para transformar bacterias y obtener cantidades suficientes para su uso.

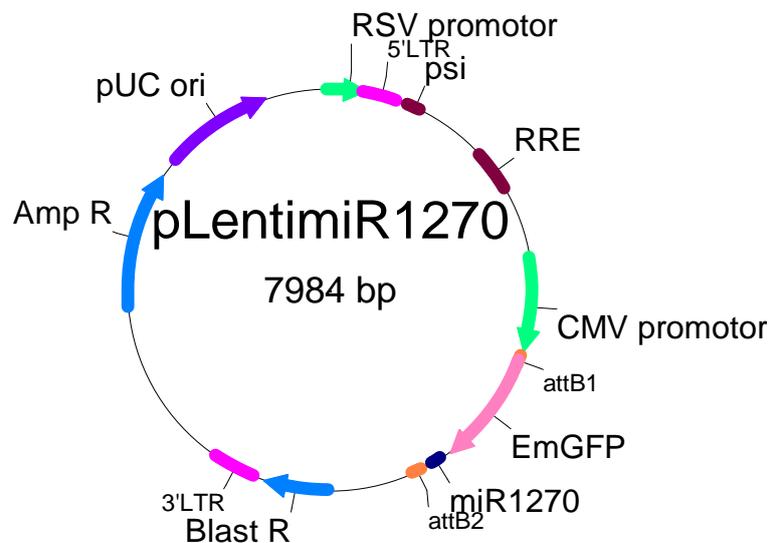


Fig. 22: Esquema del pLentimiR-1270. Se muestra el casete de expresión del miR-1270 proveniente del pcDNAmiR-1270 que va desde el sitio *attB1* hasta el *attB2* (en naranja). Creado en el software A Plasmid Editor, ApE.

La selección de bacterias que hayan sido transformadas con el plásmido pLentimiR-1270 se realiza mediante el sistemas de selección por la resistencia al antibiótico ampicilina. De todas las colonias que crecieron en agar LB adicionado con Ampicilina, se seleccionaron 7, las cuales se inocularon en medio LB+Amp para realizar un protocolo de extracción de plásmido por lisis alcalina.

En la figura 23 se muestra la imagen del gel de agarosa donde se corrieron los siete plásmidos extraídos por lisis alcalina provenientes de las colonias transformadas que crecieron en agar LB+Amp; el gel fue observado y fotografiado en el fotodocumentador. En esta imagen se observa que, de los siete extractos, solo cinco parecen tener el plásmido.

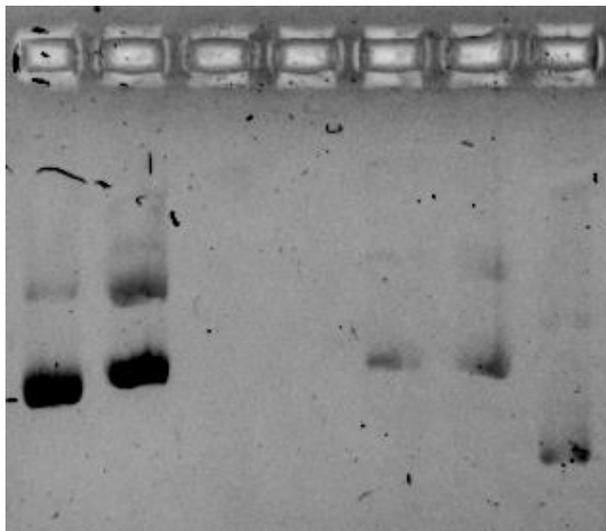


Fig. 23: Clonas de pLentimiR-1270 replicadas en *E. coli* OneShot® Stbl™ 3 y extraídas por lisis alcalina. De izquierda a derecha se muestran las clonas denominadas como 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7.

Debido a que no es posible saber con este único análisis si los plásmidos obtenidos corresponden al VT, se procede a probar tres de estas siete clonas (1,2 y 6) en células 293FT para verificar la presencia del gen reportero EmGFP.

8.2.2 Verificación de la presencia del gen reportero en el VT mediante transfección en células 293FT

A pesar de que existen técnicas dirigidas a evaluar la sobreexpresión inducida de un microRNA dentro de una célula, como la qRT-PCR (*quantitative real time polymerase chain reaction*), durante todo este trabajo se midió la expresión del miR-1270 de manera indirecta mediante la expresión del gen reportero localizado río arriba de este, dentro del mismo casete de expresión. El gen reportero corresponde a la proteína verde esmeralda fluorescente (EmGFP), modificación de la proteína verde fluorescente (GFP). La expresión de esta proteína puede ser observada por microscopia de fluorescencia -o, como en este

ensayo, a través un simulador de microscopio invertido- desde las primeras horas de expresión (24 a 48 horas después de la introducción del DNA), facilitando el rastreo de las células transfectadas.

La expresión de la EmGFP puede correlacionarse al 100% con la del miRNA; ya que la expresión de ambos está controlada por un mismo promotor: el promotor de citomegalovirus humano (CMV); un promotor fuerte que conduce a la expresión constitutiva de altos niveles de los genes que regula en células de mamíferos. Se dice entonces que la EmGFP funciona como gen reportero; es decir, aquel cuya expresión anuncia de manera indirecta la expresión de otro.

En este ensayo, se probaron 3 de las 7 clonas de pLentimiR-1270 en la línea celular 293FT donde la presencia de la EmGFP en las células transfectadas se tomó como indicador positivo de la expresión del miR-1270.

La introducción del pLentimiR-1270 a las células 293FT se llevó a cabo mediante transfección con lípidos catiónicos (lipofección). La lipofección es una de las técnicas no virales de entrega de genes; se basa en la formación de complejos entre las moléculas de DNA que se busca introducir a las células y liposomas (estructuras lipídicas a su vez formadas por varias moléculas de lípidos catiónicos) que facilitan la internalización del DNA a las células. La carga neta negativa de las moléculas de DNA establece una interacción iónica con la carga positiva de los lípidos catiónicos que conforman el liposoma resultando en una estructura cuya forma y estabilidad depende de las características de los lípidos catiónicos que se utilicen y de la proporción en que estos se encuentren con respecto al DNA.

El reactivo Lipofectamina utilizado en este trabajo consta de una mezcla de los lípidos DOSPA (2,3-dioleiloxi-N-[2(esperminecarboxamido)etil]-N,N-dimetil-1-propanamino trifluoroacetato) y DOPE (dioleoilfosfatidiletanolamina) (figura 24).

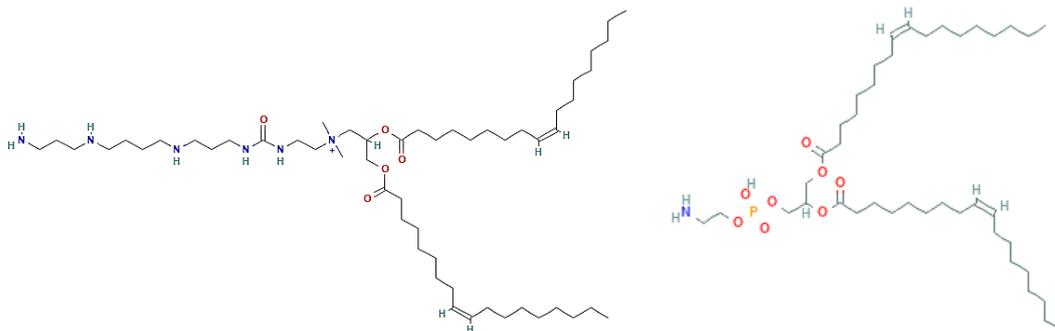


Fig. 24: DOSPA y DOPE. Componentes del reactivo Lipofectamina.

La variación en aspectos estructurales, como el tamaño de la cabeza polar y el largo de la cola hidrocarbonada, confiere al complejo lípido-DNA diferentes características que afectan directamente la asociación y liberación dentro de las células, así como la eficacia de transfección y los niveles de citotoxicidad. Otro parámetro a considerar es la proporción Lipofectamina:DNA que se utilizará ya que, aunque el inserto del reactivo Lipofectamine®2000 menciona que la proporción 3:1 es adecuada, el efecto puede variar de una línea celular a otra.

De manera experimental, se determinó que las células 293FT utilizadas en este trabajo, se transfectaban con eficacia a una proporción 2:1 y que, aumentar la proporción, lejos de aumentar la eficacia de transfección, dañaba las células sembradas en monocapa.

Pasadas 24 h desde la transfección, las células son visualizadas al microscopio de fluorescencia. Aquellas células que hayan sido transfectadas con el pLentimiR-1270 serán capaces de expresar la proteína EmGFP y esta al ser excitada, emitirá fluorescencia visible a través de los lentes objetivos. Aquellas células que no hayan sido transfectadas con este plásmido, se observan en el campo claro más no a través de los filtros para EmGFP. Las tres clonas del pLentimiR-1270 probadas fueron positivas para la expresión de EmGFP. Así, se seleccionó una de estas clonas de plásmido para generar una cantidad mayor de este y extraerlo por lisis alcalina y purificarlo mediante el uso de columnas con matriz de sílice. Estas columnas confieren la ventaja de que atrapan endotoxinas bacterianas, dejando el DNA en óptimas condiciones para su transfección en células de mamíferos.

8.2.3 Sistemas de vectores lentivirales de Segunda y Tercera Generación.

Como se mencionó con anterioridad, el modelo para el desarrollo de vectores lentivirales como mecanismo de entrega de genes fue el virus de inmunodeficiencia humana 1 (VIH-1). Los vectores lentivirales (VL) son, generalmente, producidos por transfección transitoria de tres o más plásmidos⁴⁶, los cuales contienen los genes esenciales para la formación de una partícula retroviral no competente para la replicación. Los sistemas de segunda y tercera generación tienen, entonces, el objetivo de disminuir la frecuencia de aparición de partículas virales eficientes en la replicación resultado de múltiples eventos de recombinación; ya sea entre los genes transferidos en los diferentes plásmidos, o con los retrovirus endógenos preexistentes en la célula hospedera.

La tabla 11 describe los elementos contenidos en cada uno de los vectores que conforman ambos sistemas.

Tabla 11. Vectores que conforman los Sistemas de Segunda y Tercera generación

Plásmido	Elemento	Función
Vector de transferencia de ambos sistemas		
pLentimiR-1270	miR-1270	Secuencia del miR-1270, corresponde a la secuencia de interés a transfectar para estudios posteriores de silenciamiento.
	EmGFP	Gen reportero de la expresión de la secuencia de interés. Codifica para la proteína verde esmeralda fluorescente, una modificación de la proteína natural de <i>Aequorea victoria</i> .
	LTRs	Repetidos largos terminales, sitios necesarios para la inserción del vector de transferencia dentro del genoma de la célula hospedera. Al pertenecer a un VL de tercera generación, la 3'LTR presenta una delección mientras que la 5'LTR está conformada solo por R y U5.
	RSV promotor	Promotor de Rous Sarcoma Virus, permite la transcripción de genes en células eucariotas.
	Ψ (psi)	Señal de empaquetamiento y dimerización del genoma de la progenie viral.
	RRE	Elemento de respuesta a Rev, tras la unión de Rev a este sitio en los transcritos no splicados, se permite la exportación del complejo Rev-RNA del núcleo.
	pUC ori	Origen de replicación en células procariontes proveniente del plásmido pUC. Permite la generación de muchas copias del plásmido cuando es transformado en bacterias competentes.
	Amp R	Gen de resistencia a ampicilina. Permite la selección de las bacterias transformantes a partir de las cuales es posible extraer este plásmido.

	attBs	Sitios de recombinación attB1 y attB2. Se generan después de la reacción de recombinación LR que da origen a este plásmido.
Sistema de Segunda Generación		
psPAX2	VIH-1 gag	Gen gag proveniente de VIH-1. Codifica para la poliproteína Gag cuyos productos corresponden a proteínas estructurales: CA, NC y MA.
	VIH-1 pol	Gen pol proveniente de VIH-1. Codifica para la poliproteína Gag-Pol que dará origen a las proteínas enzimáticas: RT, IN, PR.
	VIH-1 rev	Gen rev de VIH-1. Codifica para la proteína Rev necesaria para la exportación nuclear de los transcritos virales no spliceados.
	VIH-1 tat	Gen tat de VIH-1. Codifica para la proteína Tat, la cual al unirse a TAR promueve la fosforilación de la RNA pol II de la célula hospedera aumentando su procesividad. Permite la transcripción completa de los mRNAs policistrónicos.
	RRE	Elemento de respuesta a Rev, tras la unión de Rev a este sitio en los transcritos no spliceados, se permite la exportación del complejo Rev-RNA del núcleo.
	TAR	Elemento de respuesta a Tat, la unión de Tat a este sitio dentro del DNA transfectado desencadena la formación del complejo P-TEFb (factor positivo de la elongación de la transcriptasa) cuyo dominio Cdk9 (cinasa dependiente de ciclina 9) fosforila la RNA pol II aumentando su procesividad.
	SV40 promotor	Promotor de Virus Simio 40, permite la transcripción de genes en células eucariotas.
	CMV enhancer	Potenciador de la transcripción en células eucariotas proveniente de Citomegalovirus.
	Ori	Origen de replicación en células procariontes. Permite la generación de muchas copias del plásmido cuando es transformado en bacterias competentes.
	Amp R	Gen de resistencia a ampicilina. Permite la selección de las bacterias transformantes a partir de las cuales es posible extraer este plásmido.
pMD2.G	VSV-G	Gen de glicoproteína del Virus de Estomatitis Vesicular, glicoproteína de envoltura utilizada para pseudotipificar los vectores resultantes con la finalidad de aumentar el tropismo de estos mismos.
	CMV promotor	Promotor de Citomegalovirus, permite la transcripción de genes en células eucariotas.
	CMV enhancer	Potenciador de la transcripción en células eucariotas proveniente de Citomegalovirus.
	Ori	Origen de replicación en células procariontes. Permite la generación de muchas copias del plásmido cuando es transformado en bacterias competentes.
	Amp R	Gen de resistencia a ampicilina. Permite la selección de las bacterias transformantes a partir de las cuales es posible extraer este plásmido.
Sistema de Tercera Generación		

pLP1	VIH-1 gag	Gen gag proveniente de VIH-1. Codifica para la poliproteína Gag cuyos productos corresponden a proteínas estructurales: CA, NC y MA.
	VIH-1 pol	Gen pol proveniente de VIH-1. Codifica para la poliproteína Gag-Pol que dará origen a las proteínas enzimáticas: RT, IN, PR.
	CMV promotor	Promotor de Citomegalovirus, permite la transcripción de genes en células eucariotas.
	RRE	Elemento de respuesta a Rev, tras la unión de Rev a este sitio en los transcritos no splicados, se permite la exportación del complejo Rev-RNA del núcleo.
	pUC ori	Origen de replicación en células procariontes proveniente del plásmido pUC. Permite la generación de muchas copias del plásmido cuando es transformado en bacterias competentes.
	Amp R	Gen de resistencia a ampicilina. Permite la selección de las bacterias transformantes a partir de las cuales es posible extraer este plásmido.
pLP2	VIH-1 rev	Gen rev de VIH-1. Codifica para la proteína Rev necesaria para la exportación nuclear de los transcritos virales no splicados.
	RSV promotor	Promotor del Virus del sarcoma de Rous, permite la transcripción de genes en células eucariotas.
	pUC ori	Origen de replicación en células procariontes proveniente del plásmido pUC. Permite la generación de muchas copias del plásmido cuando es transformado en bacterias competentes.
	Amp R	Gen de resistencia a ampicilina. Permite la selección de las bacterias transformantes a partir de las cuales es posible extraer este plásmido.
pLP-VSVG	VSV-G	Gen de glicoproteína del Virus de Estomatitis Vesicular, glicoproteína de envoltura utilizada para pseudotipificar los vectores resultantes con la finalidad de aumentar el tropismo de estos mismos.
	CMV promotor	Promotor de Citomegalovirus, permite la transcripción de genes en células eucariotas.
	pUC ori	Origen de replicación en células procariontes proveniente del plásmido pUC. Permite la generación de muchas copias del plásmido cuando es transformado en bacterias competentes.
	Amp R	Gen de resistencia a ampicilina. Permite la selección de las bacterias transformantes a partir de las cuales es posible extraer este plásmido.

El objetivo de trabajar con ambos sistemas es comprobar experimentalmente y de manera cualitativa sí es que el sistema de segunda generación, a pesar de ser menos seguro, es más eficaz en cuanto a la formación de VL. Debido a que la producción de VL se realizó por co-transfección transitoria de los diferentes plásmidos que integran ambos sistemas, una célula de empaquetamiento será capaz de formar VL funcionales si y solo si adquiere al menos una copia de cada uno de los plásmidos de cada sistema. En términos de probabilidad, es más

factible que una misma célula adquiriera una copia de cada plásmido del sistema cuando el sistema está conformado por menos plásmidos diferentes. Por esta razón, una de las hipótesis iniciales es que la cosecha de VL de segunda generación tendrá un título viral más elevado comparado con la cosecha de tercera generación; lo cual podrá comprobarse al infectar células nuevas con ambas cosechas en eventos independientes. Sí efectivamente, el título viral de la cosecha de segunda generación resulta más elevado, la cantidad de células infectadas que expresen el gen reportero EmGFP será mayor y muy notoria al observar las células infectadas al EVOS.

La replicación de todos los plásmidos se realizó en bacterias *E. coli* DH5 α quimio competentes previa transformación de las mismas por la técnica de choque térmico (anexo 5). Todos los extractos de los diferentes plásmidos se cuantificaron a través de un espectrofotómetro NanoDrop y se diluyeron hasta llevarlos a una concentración de 100 μ g/mL con el fin de unificar la concentración de los extractos y así tener un mejor control sobre las cantidades añadidas al realizar los ensayos.

8.2.4 Protocolo de producción de vectores lentivirales (VL) en la línea celular de empaquetamiento 293FT: Co-transfección, cosecha e infección

La producción de VL se realizó por co-transfección transitoria de los plásmidos que conforman los dos diferentes sistemas. Experimentalmente, estos ensayos se dividieron en tres etapas:

1. Co-transfección transitoria: para la producción de partículas virales deficientes en la replicación. Se realizó en la línea celular de empaquetamiento 293FT mediante la técnica de transfección por lípidos catiónicos, utilizando el reactivo Lipofectamine®2000.
2. Cosecha de los vectores lentivirales: cosecha de los sobrenadantes del cultivo celular transfectado, lisando las células transfectadas por acción mecánica y filtrando para eliminar el desecho celular, dejando en suspensión únicamente las partículas virales obtenidas.

3. Cálculo del título lentiviral: estimación cualitativa de la cantidad de partículas virales infectivas efectivas mediante la observación de la presencia del gen reportero al EVOS en células 293FT infectadas con diluciones sucesivas de las cosechas lentivirales.

El objetivo principal de estos ensayos es definir una línea de trabajo por la cual sea posible seguir experimentando hasta obtener un título lentiviral lo suficientemente elevado para infectar células de monocitos humanos de sangre periférica. Durante todo el tiempo que se realizaron los ensayos de producción de VL, el protocolo original -en sus tres diferentes etapas- sufrió diversas modificaciones a fin de lograr el objetivo propuesto.

Efecto del piruvato de sodio en la producción de Vectores Lentivirales (VL)

Los primeros ensayos de producción de VL que se realizaron fueron infructíferos y no progresaron hasta la cosecha ni la infección debido a que la transfección no resultó exitosa. En un principio se tenía una muy pequeña cantidad de células transfectadas (expresión de EmGFP), así como una nula formación de sincitios.

Estos primeros intentos se realizaron sin piruvato de sodio adicionado al medio y fue la producción casi nula de VL lo que llevó a la determinación de que el piruvato de sodio es crucial para el procesamiento de los viriones. Esto se debe a que, el piruvato de sodio, es fuente de carbono que puede incorporarse al segundo paso de la respiración celular, oxidándose a acetil-CoA, molécula que entra al ciclo de los ácidos tricarboxílicos donde se generan varias moléculas de los acarreadores de electrones (tres moléculas de NADH y una de FADH₂), las cuales participan en el paso final de la respiración, la fosforilación oxidativa, cuyo producto final es la producción de ATP a partir de la fuerza protón motriz que activa la enzima ATP sintasa. De esta manera, el piruvato aporta la energía necesaria para que las células 293FT lleven a cabo el procesamiento de los VL.

Por esa razón, el protocolo de transfección considerado como inicial, contempla la adición de piruvato de sodio al medio.

Primera modificación al protocolo: Cantidades de plásmidos y proporción DNA:Lipofectamina. Efecto del aumento de la cantidad de plásmido de empaquetamiento en el protocolo de producción de Vectores Lentivirales (VL)

Una vez implementada la adición de piruvato de sodio, el protocolo de co-transfección con las primeras cantidades de plásmido y lipofectamina propuestas (tabla 10), brindó los primeros resultados positivos. La figura 26 muestra las células 293FT co-transfectadas con las primeras cantidades de plásmido utilizadas (tabla 10). Para ambos sistemas se observa una gran cantidad de células transfectadas que expresan el gen reportero; sin embargo, no hay gran presencia de efecto citopático lo cual se denota en la casi nula formación de sincitios.

Comparando los resultados del sistema de segunda generación (25 A-B) con los de tercera generación (25 C-D), se observa mayor número de sincitios en las células transfectadas con los plásmidos de tercera generación que en las transfectadas con el sistema de segunda generación.

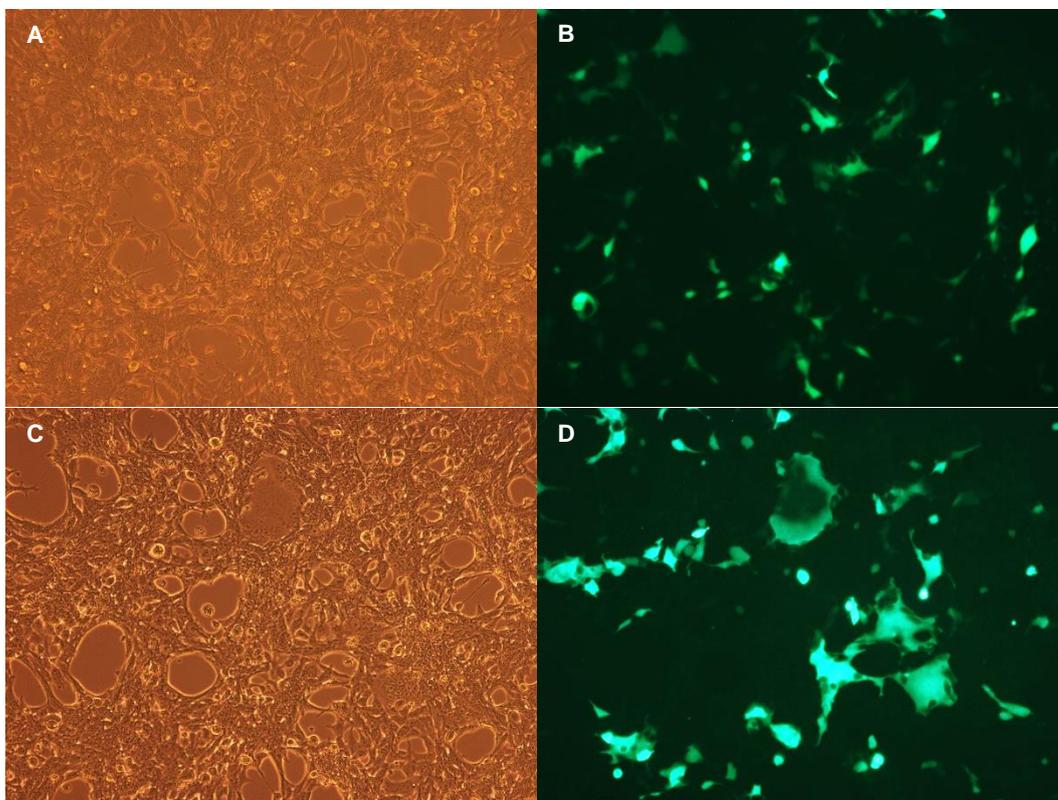


Fig. 25: Células 293FT. Co-transfección transitoria utilizando las cantidades de plásmido de la tabla 10 correspondientes a los sistemas de segunda generación: campo claro (A) y filtro GFP (B), y de tercera generación: campo claro (C) y filtro GFP (D). Tomadas con el EVOS, aumento 10x.

Las células transfectadas se llevaron a término y se cosecharon los medios de cultivo y células de este experimento. Sin embargo, la infección realizada con estas cosechas no mostró células verdes, es decir infectadas, después de 48 horas. Una explicación a este efecto fue que posiblemente las células de empaquetamiento estuvieran tomando el plásmido pLenti-miR-1270 pero no así el resto de los plásmidos de empaquetamiento. Con base en esto, se decidió modificar las cantidades de cada uno de los plásmidos en la mezcla de transfección.

La proporción de Lipofectamina también se modificó al observar que, en algunos ensayos, la proporción 3:1 maltrataba ligeramente la monocapa celular mientras que la proporción 2:1 brindaba los mismos resultados sin maltratar las células 293FT. Estas modificaciones se exponen en la tabla 12.

Tabla 12. Cantidades de plásmidos y lipofectamina modificadas.

Tubo	Plásmido	Cantidad de plásmido	Cantidad Lipofectamina
Sistema de Segunda Generación			
A	pLenti-miR1270	3.5 µg	
	psPAX2	2.5 µg	
	pMD2.G	1 µg	
B			14 µL
Sistema de Tercera Generación			
A	pLenti-miR1270	2.5 µg	
	pLP1	2.5 µg	
	pLP2	1.5 µg	
	pLP-VSVG	1 µg	
B			15 µL

Tras esta modificación se obtienen las fotografías de la figura 27, en estas se muestra un aumento notable en la cantidad de células verdes fluorescentes (células transfectadas). Así mismo, se observa una gran cantidad de sincitios. Nuevamente, la comparación entre un sistema y otro no muestra diferencias significativas.

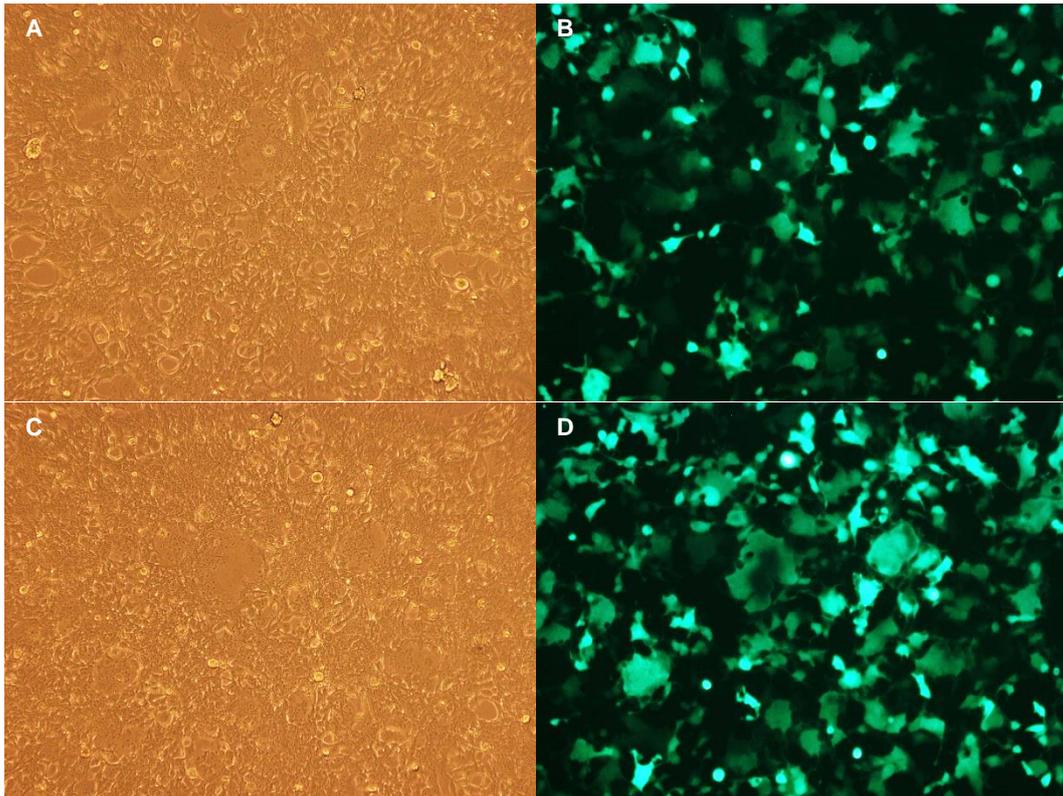


Fig. 26: Células 293FT. Co-transfección transitoria con las cantidades de plásmido de la tabla 13 correspondientes a los sistemas de segunda generación: campo claro (A) y filtro GFP (B), y de tercera generación: campo claro (C) y filtro GFP (D). Tomadas con el EVOS, aumento 4x.

De este mismo ensayo, se obtuvieron las fotografías presentadas en la figura 28 donde el objetivo de aumento 20x permite una mejor visualización de los sincitios formados. Se puede observar de manera clara la formación de células gigantes multinucleadas resultado de la fusión de varias células 293FT.

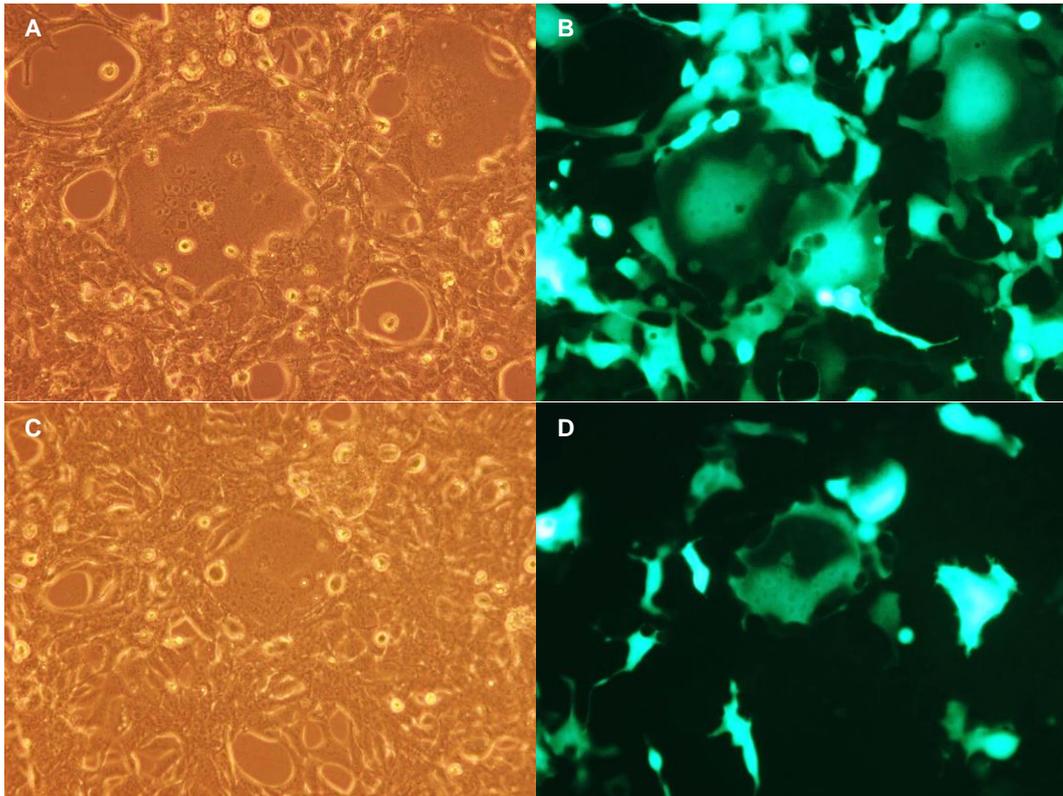


Fig. 27: Formación de sincitios, células co-transfectadas con los plásmidos de los sistemas de segunda generación: campo claro (A) y filtro GFP (B), y tercera generación: campo claro (C) y filtro GFP (D). Tomadas con el EVOS, aumento 20x.

Una vez establecidas las cantidades de plásmido y lipofectamina a utilizar, se cosecharon los vectores lentivirales provenientes de esta co-transfección sin filtrar y se utilizaron para infectar un cultivo nuevo de 293FT.

Los resultados de esta infección se muestran en la figura 28. La presencia de sincitios en este ensayo resaltó el hecho de que las cosechas no fueron filtradas y que los sincitios observados fueron acarreados, durante la cosecha, desde la co-transfección hasta la infección.

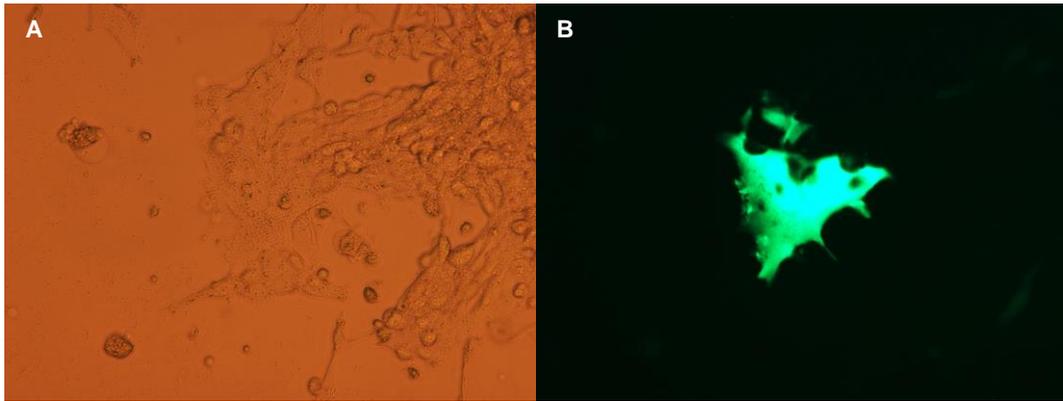
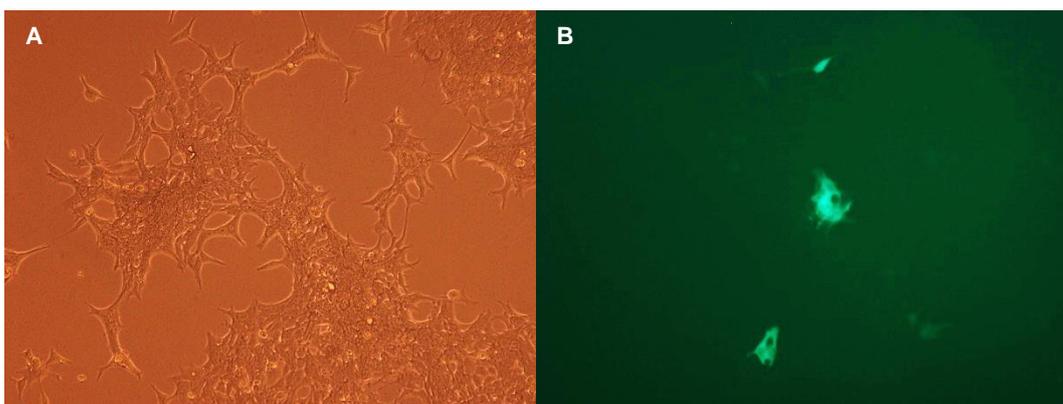


Fig. 28: Células 293FT infectadas con la cosecha del ensayo de co-transfección transitoria, sistema segunda generación, cantidades de plásmido modificadas y sin filtrar; campo claro (A) y filtro GFP (B). Se observa la presencia de un sincitio. Tomada con el EVOS, aumento 20x.

Estos resultados se tomaron como no confiables al ser posible que se tuviera una sobreestimación de la cantidad real de VL producidos por efecto de la presencia de células transfectadas -en lugar de infectadas- provenientes del primer ensayo. Se decidió entonces que el protocolo inicial de cosecha debía considerar la filtración de los sobrenadantes antes de realizar la infección.

Se lleva a cabo un nuevo ensayo donde se considera la filtración de las cosechas previa infección. Los resultados se muestran en la figura 29. Se destaca de estas fotografías el hecho de que no hay presencia de sincitios; así mismo, hay células 293FT infectadas, aunque en muy baja cantidad; ya que estas imágenes corresponden a la dilución 1:2.



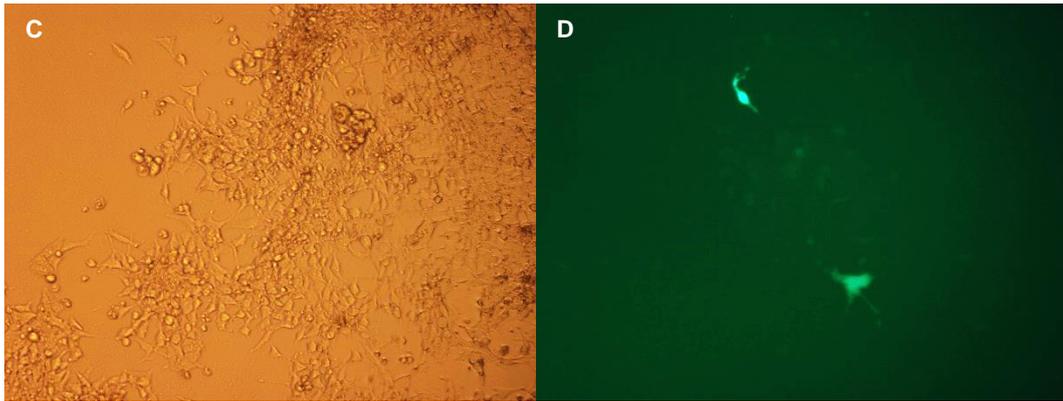


Fig. 29: Células 293FT infectadas con la cosecha filtrada dilución 1:2; sistema de segunda generación: campo claro (A) y GFP(B), y de tercera generación: campo claro (A) y filtro GFP (B). Tomada con el EVOS, aumento 10x.

De esta primera parte de modificaciones se determinó la cantidad de cada plásmido que se utilizará para la co-transfección y la detección de dos pasos críticos: la adición de piruvato de sodio durante la co-transfección y la filtración de los sobrenadantes una vez que han sido cosechados.

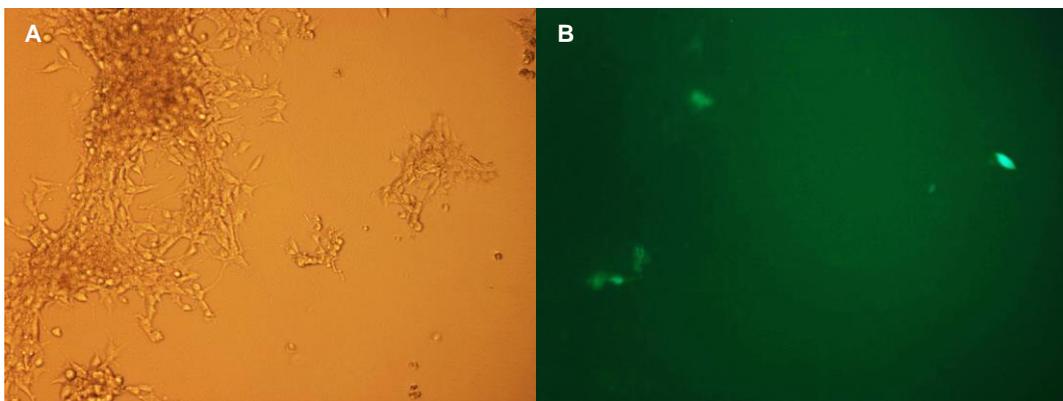
Se sabía que las nuevas cantidades de plásmidos propuestas y la adición de piruvato de sodio estaban resultando en la producción de partículas virales; ya que los productos metabólicos de desecho, que se concentraban en el medio, eran tantos que acidificaban el medio de una manera más rápida que cuando no se observaba producción de VL. Este cambio se observaba gracias a la presencia de rojo de fenol en el DMEM, el cual exhibe un color amarillo-naranja cuando el pH disminuye. Se pensó entonces qué, quizá, el problema ya no era que no se estuvieran produciendo VL, sino que estos se dañaban a consecuencia del pH ácido en el que se conservaban desde su producción mediante co-transfección transitoria, hasta su utilización en los ensayos de infección. La rápida disminución del pH comenzaba también a despegar la monocapa de células en algunas secciones de las placas, otro factor que podría estar influyendo en el bajo título lentiviral obtenido al infectar.

Segunda modificación: Adición de HEPES al medio DMEM*(adicionado con SFB 10%, Pen-Strep 100 U/mL y 0.1 mg/mL de piruvato de sodio, ver ANEXO 7).

El medio DMEM contiene rojo fenol como indicador y usa las sales de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) y fosfato monobásico de sodio (NaH_2PO_4) para crear un tampón que mantiene el pH del medio en un rango de 7.2-7.6. Cuando el pH desciende a menos de 6.8, el color del medio pasa de rojo-naranja a amarillo, indicador visual de la acidificación del medio. A pH muy bajo se observa que las células comienzan a morir y despegarse de la superficie; efecto que trató de remediarse añadiendo una sal con mayor capacidad de amortiguamiento: el ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanesulfónico (HEPES).

Para ello, el medio DMEM* se suplementó con HEPES a una concentración final 0.01M. El medio DMEM*- HEPES se añadió una vez que se retiró el medio de co-transfección transcurrido el tiempo de incubación. A partir de ese momento, cada recambio o adición de medio realizado fue con este medio. Este cambio resultó muy benéfico para la conservación de la integridad de la monocapa por al menos 24 h hasta la primer cosecha y recambio de medio.

La adición de HEPES produjo un ligero incremento en la aparición de células infectadas. La imagen 30 muestra las fotografías de la infección de células 293FT con cosechas provenientes de un ensayo con todas las modificaciones antes mencionadas; incluyendo la adición de HEPES. En estos resultados, se aprecia para ambos sistemas un ligero aumento en la cantidad de células infectadas; sin embargo, la cantidad de estas sigue siendo muy baja.



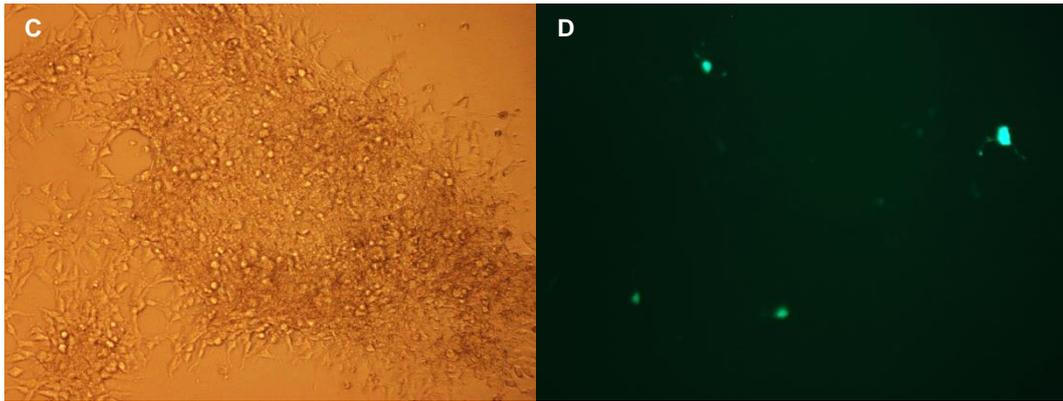


Fig. 30: Células 293FT infectadas con VL producidos y cosechados en medio adicionado con HEPES, dilución 1:2. Tomadas con el EVOS, aumento 10x.

Tercera modificación: Alicuotado de las cosechas lentivirales previa conservación.

Otro factor que se sabe afecta la integridad y funcionalidad de los VL es el cambio brusco de temperatura. Estos viriones se conservan correctamente a 4°C por periodos cortos de tiempo (hasta 3 semanas) y a -80°C por periodos de tiempo prolongados. La descongelación de las cosechas, aún cuando el proceso sea suave, también puede dañarlos; por lo que generalmente cuando son descongelados para su utilización no deben ser congelados nuevamente. Por esta razón, se decidió realizar el alicuotado del sobrenadante inmediatamente después del filtrado de las 48 h; es decir, la cosecha filtrada de las 24 h se conservó a 4°C hasta tener la segunda cosecha y una vez juntas, se alicuotaban y almacenaban a -70°C. Después de descongelarse una alícuota, esta era inactivada con hipoclorito de sodio al 5% y desechada. Sí una alícuota iba a ser utilizada inmediatamente al día siguiente, esta no se congelaba, sino que se mantenía por 24 h más a 4°C. De la misma manera, todo el protocolo de cosecha, filtrado y alicuotado era realizado con sumo cuidado para no calentar demasiado los tubos colectores manteniéndolos todo el tiempo en hielo.

Se esperaba con esto minimizar el efecto de los cambios de temperatura en la integridad de los VL. Los resultados obtenidos tras la decisión de alicuotar las cosechas y de no congelar y descongelar las mismas, fueron satisfactorios ya que la mayor dilución en la que se obtuvieron células infectadas fue en la dilución 10^{-1} (figura 31).

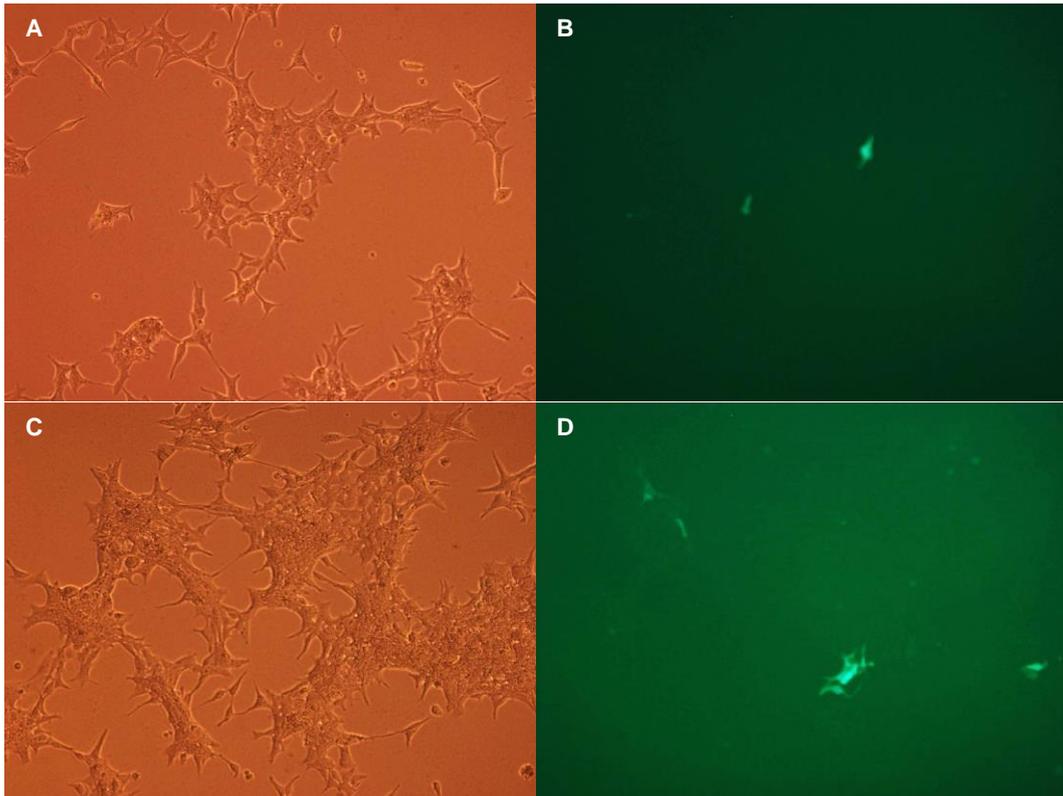


Fig. 31: Células 293FT infectadas con las cosechas alicuotadas, dilución 10^{-1} . Tomadas con el EVOS, aumento 10x.

Cuarta modificación: Efecto de la adición de polibreno (PB) en el medio de infección.

Cuando los VL son utilizados para infectar células nuevas, el primer paso para una infección efectiva es lograr la unión entre las glicoproteínas de envoltura y el receptor de membrana. Esta unión implica un acercamiento máximo entre dos partículas cuyas superficies se encuentran cargadas negativamente. La repulsión electrostática existente entre la envoltura viral y la membrana citoplasmática puede disminuirse con la adición de un polímero catiónico que pueda mediar el acercamiento entre ambos. Con la finalidad de facilitar la unión durante los ensayos de infección, se adicionó el polibreno (PB) al medio DMEM^x-HEPES.

Este polímero catiónico tiene una función muy parecida a la del lípido catiónico utilizado para la formación de los lipoplexos durante la co-transfección.

Fue con la utilización de este polímero que se lograron los mejor resultados: la señal de infección se observó hasta la dilución 10^{-3} . Las figuras 33 a 36 muestran

las imágenes obtenidas para un ensayo donde se siguieron todas las modificaciones mencionadas incluyendo la adición de PB a una concentración de 6 µg/ ml al medio.

La figura 32 contiene las fotografías obtenidas de la infección realizada con la dilución 1:2 de la cosecha. Si se comparan estas imágenes con las correspondientes a la misma dilución en otros ensayos, la diferencia es notable; tan solo en un campo es posible observar 10 veces más células infectadas que en cualquiera de los ensayos anteriores.

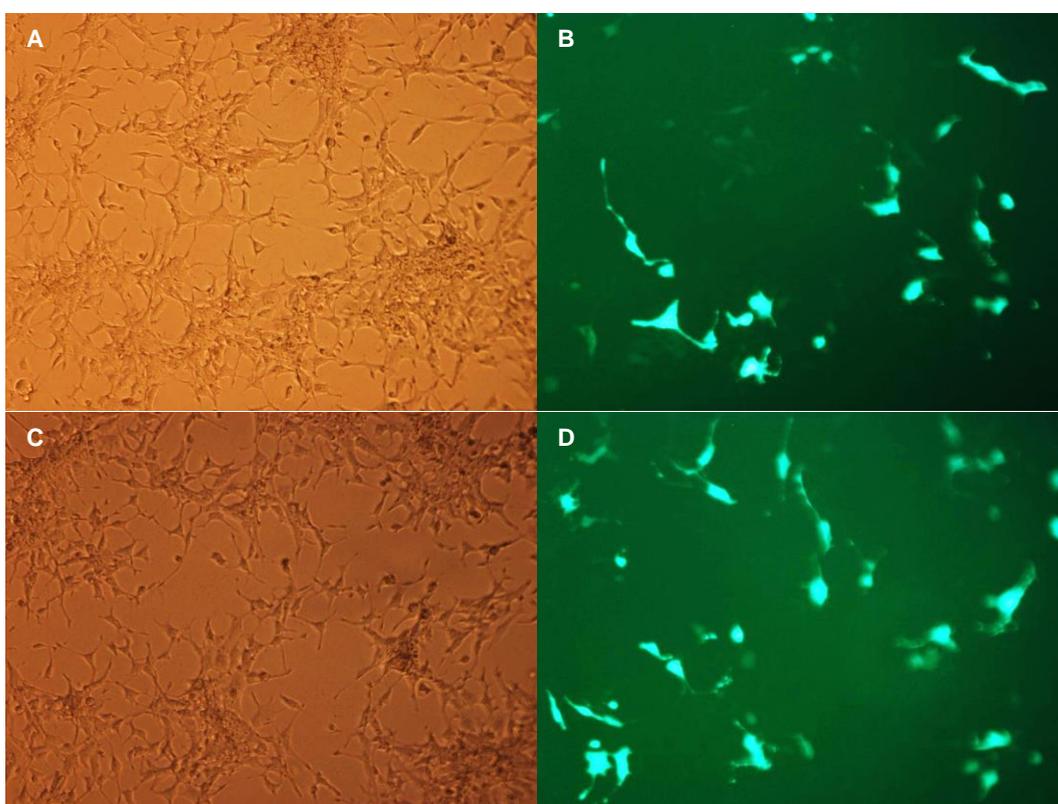


Fig. 32: Células 293FT infectadas con PB (6 µg/mL), dilución 1:2, VL de segunda generación: campo claro (A) y filtro GFP (B), y de tercera generación: campo claro (C) y filtro GFP (D). Tomadas con el EVOS, aumento 10x.

Se procede a observar los resultados de la dilución 10^{-1} de esta misma cosecha. Los resultados se muestran en la figura 33. En estas fotografías la cantidad de células infectadas ha disminuido tanto en número como en intensidad de la luminiscencia. La cantidad de células infectadas, en comparación con el único otro ensayo que brindó resultados positivos en esta misma dilución, es de aproximadamente el doble.

Comparando entre ambos sistemas, se observan más células infectadas en el sistema de tercera generación que en el de segunda generación.

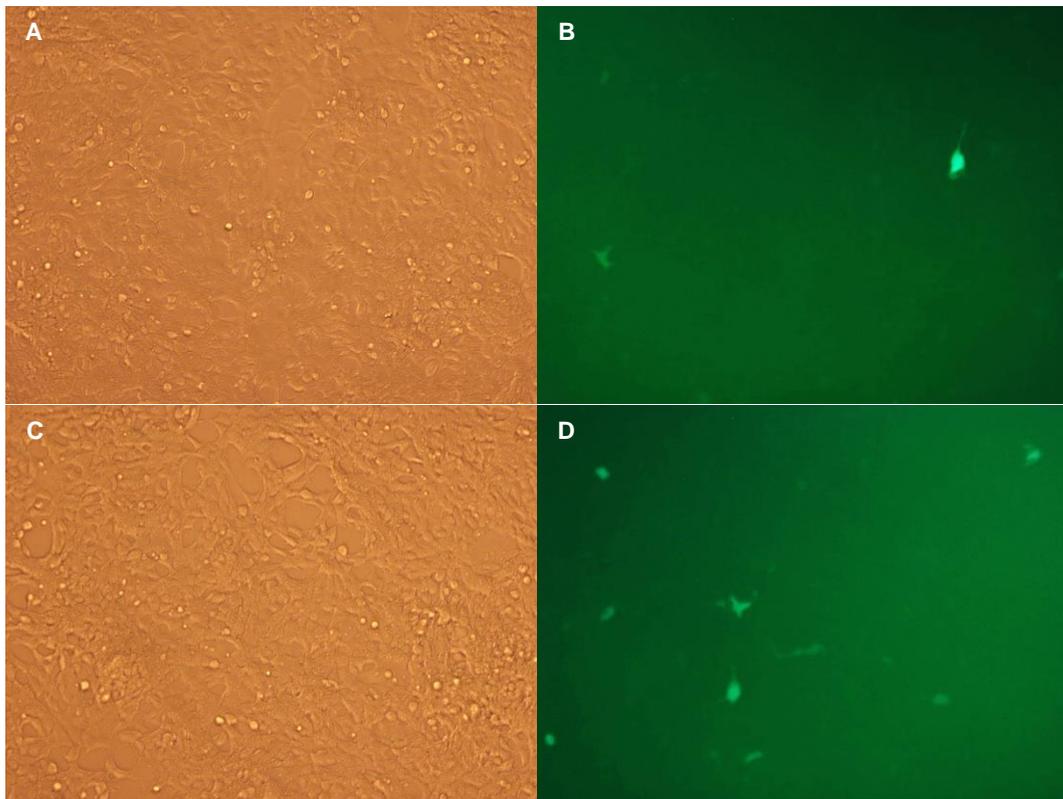


Fig. 33: Células 293FT infectadas con PB (6 µg/mL), dilución 10^{-1} , VL de segunda generación: campo claro (A) y filtro GFP (B), y de tercera generación: campo claro (C) y filtro GFP (D). Tomadas con el EVOS, aumento 10x.

En la figura 34 se muestran los resultados correspondientes a la infección de células 293FT con la dilución 10^{-2} de la misma cosecha. Aún en esta dilución se siguen observando células infectadas, aunque en muy poca cantidad. Es la adición de PB, la única modificación que proporcionó señal de células infectadas en diluciones más altas que 1:10.

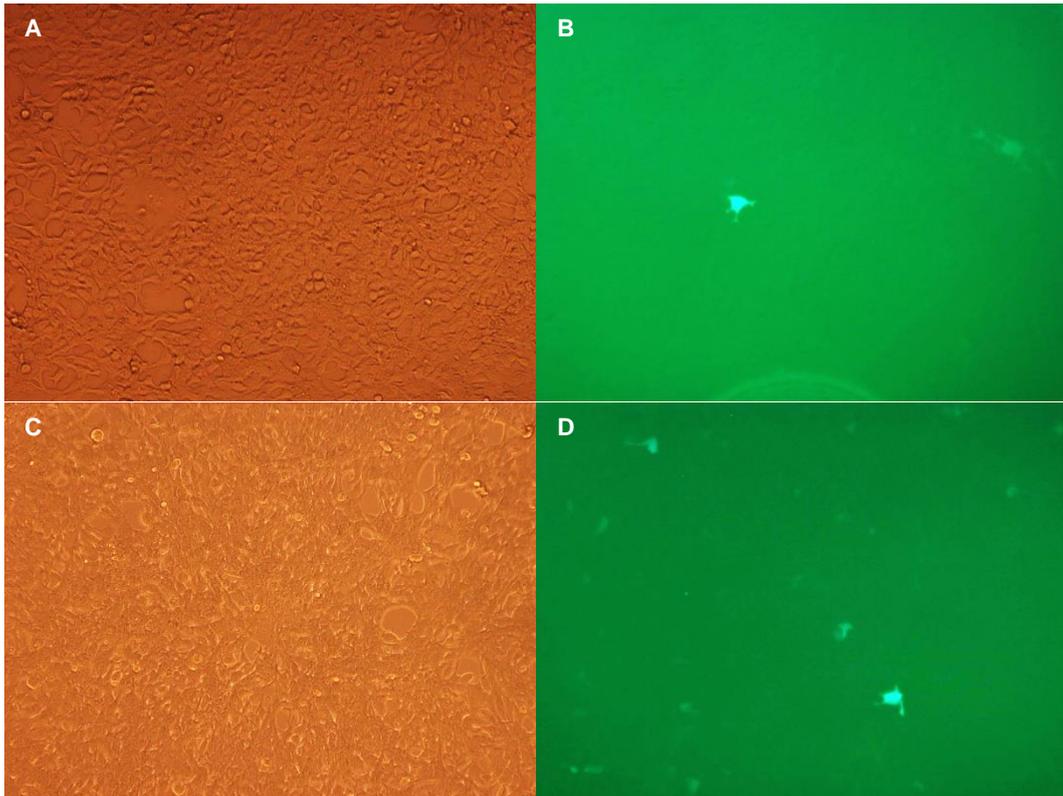


Fig. 34: Células 293FT infectadas con PB (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), dilución 10^{-2} , VL de segunda generación: campo claro (A) y filtro GFP (B), y de tercera generación: campo claro (C) y filtro GFP (D). Tomadas con el EVOS, aumento 10x.

La última dilución en la que se obtuvo señal de células infectadas con la adición de PB fue la dilución 10^{-3} ; las fotografías se muestran en la figura 35.

Resalta el hecho de que se observa apenas una célula infectada en cada fotografía. La proporción de células infectadas en esta dilución ya no es óptima para ser considerada para el cálculo del título lentiviral; sin embargo, resulta alentador el hecho de que con la adición de polibreno la señal de células infectadas haya aumentado desde la dilución 1:10 hasta la dilución 1:1000.

En esta dilución, la diferencia entre los sistemas de segunda y tercera generación ya no es notoria.

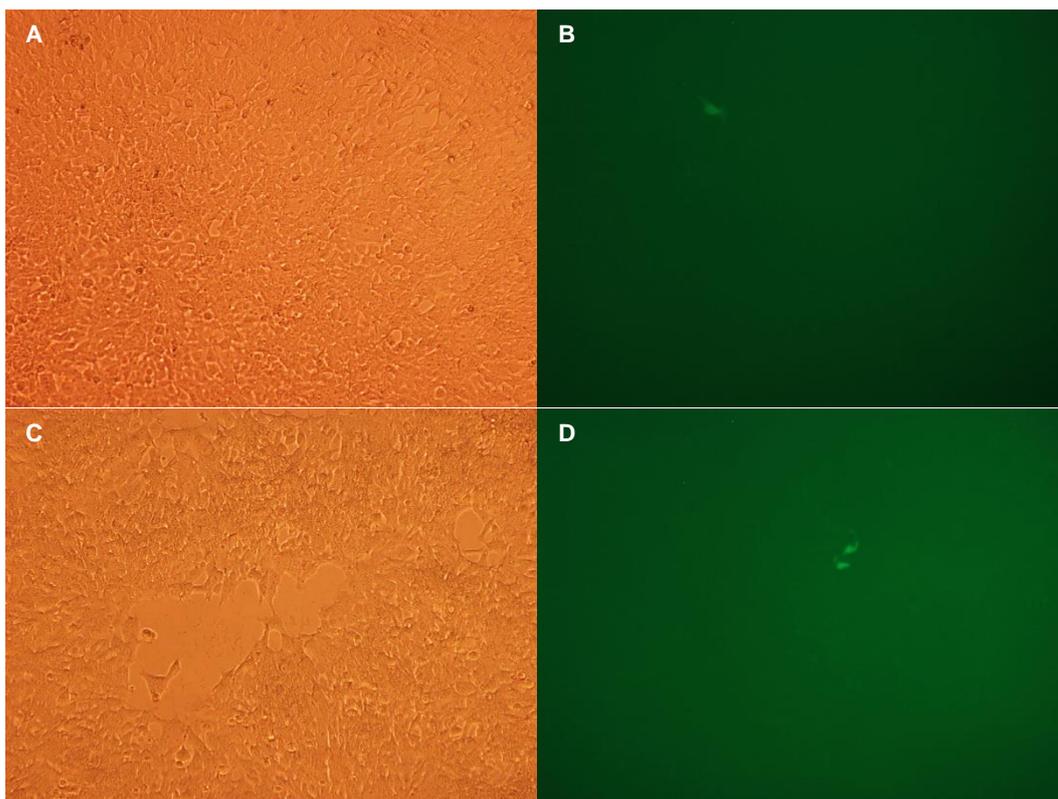


Fig. 35: Células 293FT infectadas con PB (6 $\mu\text{g}/\text{mL}$), dilución 10^{-3} , VL de segunda generación: campo claro (A) y filtro GFP (B), y de tercera generación: campo claro (C) y filtro GFP (D). Tomadas con el EVOS, aumento 10x.

A pesar de todas las modificaciones contempladas, la aparición de células infectadas no fue más allá de la dilución 10^{-3} , estando muy por debajo del título lentiviral deseado. Sin embargo, en estas cosechas que fueron positivas a partículas virales, es posible observar que el filtrado realizado funciona para la remoción de sincitios y desecho celular. En estas placas se observa únicamente la presencia de células verdes unitarias. También es posible observar que la cantidad de células verdes decrece conforme la dilución aumenta.

La comparación entre la eficiencia de producción de VL entre un sistema y otro parece no tener relevancia. Incluso, a simple vista da la impresión de que el sistema de tercera generación proporciona mejor resultados que el de segunda generación. Todo esto se concluye a partir de que la cantidad de células verdes en ambos sistemas es muy parecida.

Al tener señal de células verdes en una dilución tan baja comparado con lo esperado, no se realizó el cálculo del título lentiviral de manera formal. Aunque de haberse hecho, sería como se describe a continuación.

Sería necesario considerar la dilución 10^{-1} donde la frecuencia de células transfectadas es aproximadamente 0.001. Sabemos que el número de células totales corresponde a 175,000 células por pozo; y para preparar la dilución se tomaron 0.11 ml de inóculo y se llevó a un volumen final de 1.1 ml con medio DMEM^x-HEPES. De manera que:

$$\left(\frac{FxC}{V}\right)xD = \text{Título lentiviral}$$

$$\left(\frac{0.001 \times 175,000}{0.11 \text{ ml}}\right) \times 10^1 = 1.6 \times 10^4 \text{ UT/ml}$$

Como es posible visualizar, el objetivo propuesto de llevar el título lentiviral hasta 10^7 UT/ml aún queda lejos de alcanzarse; no obstante, el progreso obtenido con el protocolo propuesto ha tenido buenos resultados. Cabe destacar que antes de la adición de PB al medio de transfección, los resultados eran mucho menos alentadores.

Como último recurso, se optó por realizar un protocolo de concentración de las cosechas lentivirales reduciendo el volumen en el que los VL estaban suspendidos. Para ello, se realizó un ensayo de producción completo más y de manera adicional se descongelaron -y juntaron todas las cosechas -obtenidas del protocolo de producción con todas las modificaciones mencionadas- que se tenían almacenadas hasta el momento a -70°C .

Quinta modificación: Efecto de la concentración de las cosechas

La realización del protocolo de concentración de las cosechas (ANEXO 10) fue el último intento por obtener un título lentiviral lo suficientemente alto como para infectar monocitos humanos de sangre periférica. Para este punto, se tenían conservadas a -70°C múltiples alícuotas de cosechas de diferentes ensayos, todas obtenidas bajo todas las modificaciones mencionadas. Se tomó la decisión de concentrar todas las alícuotas de un mismo sistema vectorial en una sola cosecha de manera que se tuviera una gran cantidad de VL en un volumen pequeño.

Antes de elaborar el procedimiento a seguir para este ensayo, se leyeron protocolos existentes en la bibliografía consultada. Estos protocolos

consideraban condiciones que no era posible obtener dentro de nuestro laboratorio; sin embargo, se adaptaron a la capacidad instrumental y de equipo con la que se contaba.

Los resultados obtenidos tras este último intento de aumentar la cosecha viral no fueron satisfactorios en lo absoluto; ya que no se obtuvo señal de células infectadas más allá de la dilución 10^{-1} . Estos resultados pueden observarse en la figura 36.

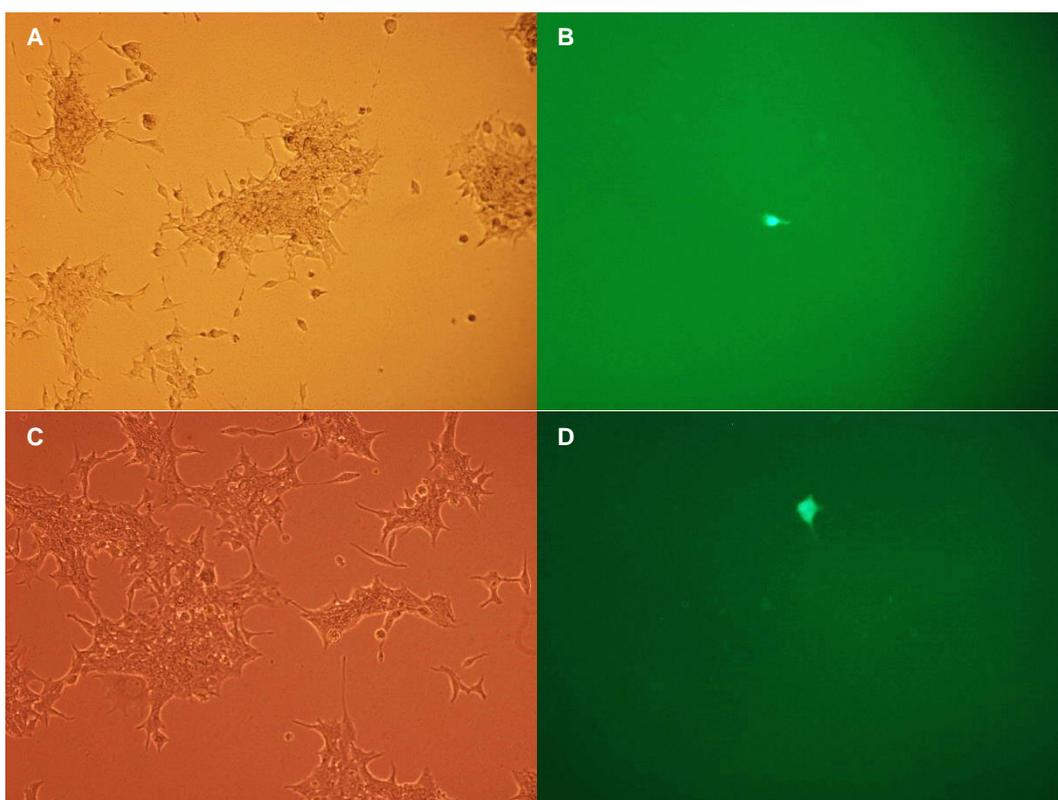


Fig. 36: Células 293FT infectadas con cosechas concentradas por centrifugación, dilución 10^{-1} , VL de segunda generación: campo claro (A) y filtro GFP (B), y de tercera generación: campo claro (C) y filtro GFP (D). Tomadas con el EVOS, aumento 10x.

9 Discusión

El estudio de los mecanismos moleculares que rigen el metabolismo óseo abre la puerta para el desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico y tratamientos para enfermedades como la osteoporosis. Los modelos de estudio empleados en esta área de investigación presentan algunas limitantes, tales como la dificultad de expresar de manera artificial genes y/o microRNAs in vitro. Es por esto que el desarrollo de herramientas que ayuden a solventar estos

inconvenientes es de gran importancia para el desarrollo de la investigación en este campo de estudio.

El uso de vectores lentivirales como herramienta de laboratorio destaca por las ventajas que los virus del género lentivirus presentan frente a vectores basados en virus pertenecientes a otras familias virales e, incluso, frente a otros vectores de la misma familia de retrovirus. Este trabajo, tuvo como objetivo establecer las condiciones óptimas de producción, cosecha e infección de vectores lentivirales de segunda y tercera generación.

En el artículo de revisión de Sakuma et. al.³⁰ se reporta que los títulos virales pueden variar dependiendo de muchos factores entre ellos: las condiciones de mantenimiento de la línea celular utilizada para la producción, el sistema de vectores y el diseño del vector de transferencia. Adicionalmente Cockrell et.al.⁵⁷ y De las mercedes et. al.⁵⁸ contemplan la adición de otros pasos de tratamiento postproducción de la cosecha (aclaramiento, purificación, concentración) como un factor que influye en la variabilidad del título lentiviral.

La manera en que el sistema de vectores utilizado influye en la variabilidad del título viral se relaciona con la cantidad de moléculas diferentes de DNA plasmídico que se requieren para lograr que una célula transfectada sea también una célula productora eficiente para cada sistema. En el sistema de segunda generación, se requieren tres plásmidos diferentes, mientras que, para el sistema de tercera generación se requieren cuatro. La hipótesis inicial es que, entre mayor sea el número de plásmidos requeridos para transfectar una célula, menor será la eficiencia de transfección; por lo tanto, un sistema de cuatro plásmidos como lo es el de tercera generación será menos eficiente para la producción de vectores lentivirales que uno de segunda generación³⁰. Esta hipótesis tiene sentido sí se considera que el proceso de transfección se da de manera aleatoria; ya que no hay forma de controlar el número y tipo de plásmidos que se introducen a una misma célula. Sin embargo, durante todos los ensayos realizados en el presente trabajo, no se observó ninguna diferencia entre los resultados proporcionados por un sistema u otro y, al no tenerse ningún indicio de que el sistema de tercera generación sea menos eficiente que el de segunda generación, es altamente recomendable continuar los estudios en este tema utilizando los plásmidos de tercera generación; ya que puede no ser menos

eficiente, pero está catalogado como más seguro para su uso en el laboratorio⁴⁹. El no encontrar diferencias entre estos sistemas durante la práctica, nos lleva a mencionar que, en la literatura, es posible encontrar ensayos tanto con sistemas de tres vectores⁵⁹⁻⁶¹ como con sistemas de cuatro vectores^{25,51,52} y si se comparan, los títulos virales para todos se encuentran en el mismo orden de magnitud (10^6 UI/ml); lo cual es consistente con nuestras observaciones.

La línea celular 293FT resultó eficiente para la producción de vectores lentivirales, estos resultados concuerdan con lo reportado en estudios anteriores donde se utilizan células 293 transformadas con el antígeno T de SV40 (293T) para la producción de vectores derivados de HIV-1^{43,49,52}, y con otros estudios que emplean la misma línea celular utilizada en este trabajo^{51,54}. Las condiciones de mantenimiento de esta línea derivada de células de riñón embrionario humano se encuentran reportadas ampliamente en la literatura; sin embargo, es posible encontrar algunas variaciones. Aunque todas las referencias son consistentes con el uso de medio DMEM, en el trabajo de Oka et. al.⁵¹ se reporta que las células se suplementan con 7% de FBS mientras que en el resto de trabajos, este mismo suero se adiciona al 10%. Pese a que la variación en la concentración de suero no es grande, puede que la decisión de disminuir el suero al 7% durante la producción de vectores lentivirales se deba a que se ha identificado al suero como una de las principales fuentes de macromoléculas contaminantes en los stocks virales, dificultando el tratamiento post-cosecha de los sobrenadantes.

Dado que los vectores lentivirales producidos en este trabajo no estaban planeados para ser administrados *in vivo*, la pureza requerida en los stocks de vectores no era tan alta como en aquellos trabajos donde la administración *in vivo* de vectores lentivirales no purificados puede activar la respuesta inmune del hospedero⁶¹. De esta manera, el uso de FBS al 10% durante el proceso de producción de vectores lentivirales no representa un factor modificable durante la optimización del protocolo aquí presentado.

A pesar de que el piruvato de sodio, como auxiliar del proceso de producción de vectores lentivirales, se reporta en muy pocos ensayos^{45,50,54}, la progresión de nuestros resultados sugieren que la adición de piruvato de sodio es crítica para la producción. Siendo que, al prescindir del piruvato de sodio, la detección de

partículas virales infectivas durante la infección es nula. Se atribuyen estos los resultados a la característica del piruvato de sodio de ser fuente de carbono aprovechable para la síntesis de energía en forma de ATP, esencial para la realización de los procesos celulares involucrados en la producción de partículas virales.

Tras el esquema de cantidades de plásmido modificadas y la utilización de piruvato de sodio, las modificaciones encaminadas a optimizar el título viral de los sobrenadantes se expandieron al proceso de cosecha y infección. Todos los trabajos revisados mencionan la filtración de los sobrenadantes a través de una membrana de $0.45 \mu\text{m}$ ^{50,54,62} inmediatamente después de que han sido cosechados. Los resultados presentados en la figura 24 permiten observar la razón de esta medida: la filtración de los sobrenadantes libera a las partículas virales de restos celulares que pudieran despegarse de la placa, disminuyendo la posibilidad de sobreestimar la cantidad de células infectadas durante la infección viral. Este paso no purifica el sobrenadante por completo; ya que siguen existiendo muchas macromoléculas (ya sea provenientes del suero o de origen celular) suspendidas en la cosecha. Una de las desventajas de filtrar el sobrenadante es que algunas de las partículas virales producidas pueden perderse si la membrana llega a taparse por exceso de desecho celular; por esta razón es necesario realizar el proceso de cosecha con sumo cuidado, evitando perturbar la monocapa de células para no despegarlas. De este ensayo se obtuvo la conclusión de que la filtración de los sobrenadantes es también un paso esencial durante el proceso de producción de vectores lentivirales.

Se sabe que la temperatura y el pH son dos variables que alteran la estabilidad de viriones envueltos. El pH de mayor estabilidad para los vectores lentivirales pseudotipificados con la glicoproteína VSV-G es de 7.0 a 7.2⁵⁴; a pH's por encima de 8 y debajo de 6, la proteína de envoltura VSV-G comienza a degradarse provocando la inactivación de los vectores tras un mínimo de 10 minutos de haber estado expuestos a estas condiciones. Por otro lado, se ha determinado que a 37°C (temperatura a la que son producidos) los vectores lentivirales tienen un tiempo de vida media de 5 a 8 h, la cual aumenta a 1 a 2 días a temperatura ambiente y hasta aproximadamente 8 días a 4°C. El número de ciclos de congelamiento-descongelamiento tiene también un efecto negativo

sobre la actividad de infección de los vectores; pues se ha determinado que esta se reduce a la mitad tras los dos primeros ciclos; por lo que los vectores lentivirales deben almacenarse por periodos largos a -80°C y descongelarse la menor cantidad de veces que sea posible⁵⁸. Para contrarrestar el posible efecto del pH se adicionó HEPES al medio de infección de acuerdo con lo encontrado en el compendio de protocolos elaborado por Walker (2016)⁴⁵. En los resultados de la figura 26 es posible observar que la capacidad de amortiguamiento de esta sal parece aumentar la estabilidad de los vectores producidos, provocando a la vez un aumento en la detección de partículas virales infectivas durante la infección. En cuanto al efecto de la temperatura, la solución encontrada en diversos trabajos^{25,45,50} fue el alicuotado de las cosechas de manera tal que durante cada ensayo, se descongelara únicamente el volumen de cosecha a utilizar sin afectar la estabilidad del resto. La temperatura de almacenamiento reportada para los vectores lentivirales es de -80°C ; sin embargo, en el laboratorio se cuenta únicamente con un ultracongelador que mantiene la temperatura a -70°C . Puede que la disminución de la actividad infectiva de las partículas virales se vea mermada por estos 10°C de diferencia entre la temperatura óptima y la temperatura real utilizada; sin embargo, de acuerdo con los tiempos de vida media reportados por De las Mercedes et. al.⁵⁸, esta temperatura debería ser suficientemente baja para mantener la actividad de las partículas virales por varios meses. Particularmente, en este trabajo, los vectores lentivirales no se almacenaron por más de ocho meses a -70°C hasta ser utilizados en ensayos de infección para el cálculo del título lentiviral. Estas consideraciones resultaron suficientes para disminuir la posible pérdida de actividad de infección de las partículas existentes en las cosechas y se puede corroborar en la figura 27 que hubo un aumento significativo (de la dilución 1:2 a la dilución 1:10) en la observación de la señal de infección.

Para aquellos vectores que contienen algún transgén que pueda ser utilizado como gen reportero (o marcador), como es el caso de los vectores lentivirales pmIR-1270 que expresan la EmGFP, la cuantificación puede realizarse por medición de la expresión de este gen reportero en células blanco previamente infectadas^{30,44,47,51,58}. Por esta razón, se elaboró un protocolo para el título de los sobrenadantes que contempla la infección de células 293FT con las cosechas

frescas (un pool de los sobrenadantes a las 24 y 48h de la infección almacenadas a 4°C) de los vectores de segunda y tercera generación. A partir también de trabajos consultados, se encontró que múltiples autores reportan el uso de polímeros catiónicos como auxiliares de la infección; entre ellos el más utilizado pese a la citotoxicidad reportada, es el polibreno³⁰ aunque Denning et. al.⁵⁴ cita al DEAE-dextrano como el polímero más eficiente. Al existir diferentes concentraciones reportadas para el uso del polibreno que van desde los 6 µg/ml hasta los 9 µg/ml^{44,47,52,54,60,63}, se decide utilizarlo a la concentración más baja (6 µg/ml) con la finalidad de disminuir el mencionado efecto citotóxico inherente a este componente. Los resultados tras la adición del polibreno al medio de infección fueron mucho mejores que los hasta antes obtenidos; sin embargo, no resultaron del todo satisfactorios. Para el óptimo cálculo del título viral, se esperaba obtener en alguna placa un aproximado de 30% de células infectadas; de acuerdo con el protocolo para el cálculo del título lentiviral descrito en el inserto del estuche comercial. A pesar de encontrarnos muy lejos de tener el 30% de células infectadas, el avance que se obtuvo al incorporar todos los aspectos encontrados en trabajos anteriores es destacable; ya que bajo todas estas consideraciones la señal de células infectadas se tiene hasta la dilución 1:1000 como se puede observar en las figuras 28 a 31. Es importante mencionar también que en algunos trabajos como el de Oka et. al.⁵¹ la cosecha de los sobrenadantes se prolonga hasta las 72 horas y, particularmente, ellos infectan las células en tres ocasiones; otro ejemplo es el trabajo de Reiser et. al.⁶⁰ donde la cosecha de vectores lentivirales se extiende hasta las 80 h tras la transfección.

Pese a que esta manera de evaluar el título viral es acertada, De las mercedes⁵⁸ menciona que una mejor aproximación del título viral debe realizarse en combinación de dos métodos: uno que permita la detección de partículas virales totales (microscopía electrónica de tinción negativa, HPLC, inmunoensayos para la detección de proteínas virales, etc.) y otro que estime la cantidad de partículas virales infectivas (expresión de gen reportero o medición del mRNA del transgén). Aunque en este trabajo no se realizó ningún ensayo para la detección de partículas virales totales, este pudo haber sido de gran ayuda al proporcionar datos de la potencia del protocolo de producción en cada una de las etapas. La relación entre partículas virales totales y activas pudo utilizarse para definir sí la

razón de no contar con señal positiva durante la infección se debía a la ausencia de vectores virales o sí se trataba de la pérdida de la actividad de éstas en algún punto del procesamiento post-cosecha de los sobrenadantes.

Los títulos obtenidos para *stocks* de vectores derivados de HIV-1 se encuentran en el orden de 10^6 - 10^7 UI/ml; y se reporta en muchos trabajos la posibilidad de aumentarlo hasta 10^9 - 10^{10} a través de técnicas de concentración⁵⁷. La más comúnmente utilizada es la centrifugación por gradiente de densidad utilizando una columna de sacarosa donde el principal inconveniente es la pérdida de la actividad de infección debido a la exposición a un medio hiperosmótico que provoca la deshidratación de los viriones⁵⁸. Por esta razón, se decide optar por otro método también reportado: la ultracentrifugación. Esta ultracentrifugación debe realizarse a temperaturas bajas y velocidades muy altas, las condiciones exactas y efectivas para este proceso no se obtuvieron buscando en la literatura ya que los datos son muy variables encontrándose temperaturas de 4, 15 y 17°C con velocidades de 15,000 hasta 25,000 rpm por tiempos de 1.5 hasta 12 horas^{25,30,45,57,60,61}. Basados en el equipo con el que se cuenta en el laboratorio, se establecen las condiciones reportadas en el apartado 7.7 de la sección de materiales y métodos (14,000 rpm por 2h a 4°C). Desafortunadamente, tras el intento de concentrar las alícuotas que se tenían almacenadas a -70°C, los resultados en el ensayo de infección no fueron satisfactorios teniéndose señal de células infectadas hasta la dilución 1:10 y no más allá. La pérdida de la actividad de infección de los viriones se explica por la sensibilidad que tienen los vectores lentivirales a la velocidad de corte cuando se exponen a una alta fuerza centrífuga, la cual daña la integridad de la proteína de envoltura. Pese a que se ha reportado que la proteína VSV-G es más estable que su análogo derivado de HIV-1 (SU y TM) por ser monomérica, también existen datos que establecen que la ultracentrifugación no necesariamente resulta efectiva para el aumento del título viral⁵⁸ y este puede ser uno de esos casos.

Algunas de las limitantes encontradas durante el desarrollo práctico de este trabajo pueden encontrarse también reportadas en artículos de revisión de otros autores; la gran cantidad de reactivos y la baja disponibilidad de algunos de ellos (como la Lipofectamina) hacen que el número de ensayos que serán realizados se planifiquen y analicen con cautela; si bien es cierto que existe una gran

cantidad de artículos relacionados con este tema, las variaciones en cuanto a las condiciones bajo las que se realiza cada paso, dificultan la toma de decisiones lejos de facilitarla. Podría, en un principio establecerse que esta gran variedad se debe a que no se requiere mucha precisión al momento de elaborar un protocolo; sin embargo, bajo la experiencia personal, el amplio catálogo de posibilidades se debe a la baja reproducibilidad de los ensayos de producción de vectores lentivirales. En este caso particular, el establecimiento de un protocolo efectivo para la utilización de esta herramienta de investigación como técnica *de cajón* debe adaptarse a la situación individual de cada laboratorio basada en reactivos, equipos e instrumentos disponibles.

Así, los resultados presentados en este trabajo, dan la pauta para el establecimiento de las condiciones óptimas para la producción de vectores lentivirales que nos permitan la expresión de microRNAs en los modelos celulares de estudio para el metabolismo óseo.

10 Conclusiones

En este trabajo se determinó de manera cualitativa que las cantidades de plásmido que se utilizan durante la transfección interfieren en la cantidad de partículas virales producidas por las células de empaquetamiento; sin embargo, una vez ajustadas estas cantidades se pueden obtener proporciones constantes de células infectadas tras cada ensayo, siendo quizá la parte más reproducible de todo el protocolo. También se concluye que la adición de piruvato de sodio como fuente de energía es esencial para el procesamiento de partículas virales. La adición de un agente amortiguador, en este caso la sal HEPES, ayuda a contrarrestar la rápida acidificación del medio producto de la actividad metabólica de las células productoras de vectores lentivirales y de esta manera contribuye a la preservación de estos.

Igualmente, se observó que la temperatura es un factor a considerar cuando se cosechan los vectores lentivirales; de manera tal que trabajar las cosechas en frío y evitar los cambios bruscos de temperatura contribuye considerablemente a la preservación de las partículas lentivirales.

El establecimiento de estas condiciones de trabajo, abren la posibilidad del estudio de la expresión de microRNAs, particularmente el miR-1270, en monocitos humanos obtenidos de sangre periférica. Y de este modo poder evaluar el efecto de la expresión del miR-1270 sobre sus genes blanco mediante qRT-PCR y a nivel de proteínas por Western Blot.

11 Perspectivas

Es necesario continuar con la optimización del protocolo de producción de vectores lentivirales analizando si la concentración de las cosechas podría realizarse de otra manera considerando las condiciones que se tienen en el laboratorio.

El establecimiento de estas condiciones permitirá el análisis de la función de miR-1270 y otros microRNAs en los modelos celulares y animales de estudio disponibles para el estudio de las alteraciones del metabolismo óseo.

12 Fuentes de consulta

1. Ji, X., Chen, X. & Yu, X. MicroRNAs in osteoclastogenesis and function: Potential therapeutic targets for osteoporosis. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).
2. Lorenzo, J. & Lorenzo, J. The many ways of osteoclast activation Find the latest version : The many ways of osteoclast activation. *J Clin Invest* **127**, 2530–2532 (2017).
3. Petecchia, L., Viti, F., Sbrana, F., Vassalli, M. & Gavazzo, P. A biophysical approach to quantify skeletal stem cells trans-differentiation as a model for the study of osteoporosis. *Biophys. Chem.* **229**, 84–92 (2017).
4. Uda, Y., Azab, E., Sun, N., Shi, C. & Pajevic, P. D. Osteocyte Mechanobiology. *Curr. Osteoporos. Rep.* **15**, 318–325 (2017).
5. Chen, J. *et al.* Identification of suitable reference gene and biomarkers of serum miRNAs for osteoporosis. *Sci. Rep.* **6**, 1–11 (2016).
6. Clark, P., Tamayo, J. A., Cisneros, F., Rivera, F. C. & Valdés, M. Epidemiology of osteoporosis in Mexico. Present and future directions. *Rev. Investig. Clin.* **65**,

- 183–191 (2013).
7. Ramírez-Salazar, E. G. *et al.* Serum miRNAs miR-140-3p and miR-23b-3p as potential biomarkers for osteoporosis and osteoporotic fracture in postmenopausal Mexican-Mestizo women. *Gene* **679**, 19–27 (2018).
 8. Li, F. *et al.* Effect of stem cell therapy on bone mineral density: A meta-analysis of preclinical studies in animal models of osteoporosis. *PLoS One* **11**, 1–14 (2016).
 9. Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* **11**, 597–610 (2010).
 10. Ying, S., Chang, D. C. & Lin, S. MicroRNA Protocols. *MicroRNA Protoc.* **936**, 1–19 (2006).
 11. Jansson, M. D. & Lund, A. H. Evaluation of MicroRNA Delivery in vivo. *Mol. Oncol.* **6**, 590–610 (2012).
 12. Treiber, T., Treiber, N. & Meister, G. Regulation of microRNA biogenesis and function. *Thromb. Haemost.* **107**, 605–10 (2012).
 13. Zhang, X., Ma, X., Jing, S., Zhang, H. & Zhang, Y. Non-coding RNAs and retroviruses. *Retrovirology* **15**, 1–15 (2018).
 14. Dalglish, T. *et al.* Regulation of MicroRNAs. *Journal of Experimental Psychology: General* **136**, (2007).
 15. Acosta, A. D. L., Tapia, M. G. P. & Iturbide, J. S. Prevalencia de osteoporosis en población abierta de la Ciudad de México. *Ginecol. Obstet. Mex.* **76**, 261–266 (2008).
 16. Jiménez-Ortega, R. F. *et al.* Identification of microRNAs in human circulating monocytes of postmenopausal osteoporotic Mexican-Mestizo women: A pilot study. *Exp. Ther. Med.* **14**, 5464–5472 (2017).
 17. Zhao, B. *et al.* Interferon regulatory factor-8 regulates bone metabolism by suppressing osteoclastogenesis. *Nat. Med.* **15**, 1066–1071 (2009).
 18. Gnzburg, W. H. & Salmons, B. Retroviral Vectors. *Gene Ther. Technol. Appl. Regul.* 35–60 (2001). doi:10.1002/0470842385.ch3
 19. Adler Ph.D., R. Virus types. *Salem Press Encycl. Heal.* (2016).
 20. Carballal, G. & Oubiña., J. R. *Virología médica.* (Corpus Editorial y Distribuidora, 2014).

21. Burrell, C. J., Howard, C. R. & Murphy, F. A. Retroviruses. in *Fenner and White's Medical Virology* 317–344 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-12-375156-0.00023-0
22. Payne, S. Family Retroviridae. *Viruses* 287–301 (2017). doi:10.1016/b978-0-12-803109-4.00036-2
23. Hayward, A. Origin of the retroviruses: when, where, and how? *Curr. Opin. Virol.* **25**, 23–27 (2017).
24. Karn, J. Retroviruses. in *Brenner's Encyclopedia of Genetics: Second Edition* 211–215 (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0-12-374984-0.01323-1
25. Pfeifer, A., Lim, T. & Zimmermann, K. Lentivirus transgenesis. *Methods Enzymol.* **477**, 3–15 (2010).
26. Fan, H. Retroviruses. in *Encyclopedia of Microbiology* 519–534 (Elsevier, 2009). doi:10.1016/B978-012373944-5.00315-1
27. Cordeiro, N. & Taroco, R. Retrovirus y VIH. *Artículo Dispon. en Internet <https://docs.google.com>*. ... 449–476 (2012).
28. Lodish, H., Berk, A. & Zipursky, S. Viruses: Structure, Function, and Uses. in *Molecular Cell Biology* (ed. Freeman, W. H.) (2000).
29. Coffin, J., Hughes, S. & Varmus, H. *Retroviruses*. *Retroviruses* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1997).
30. Sakuma, T., Barry, M. A. & Ikeda, Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem. J.* **443**, 603–618 (2012).
31. Frank, H. Retroviridae. in *Virus Taxonomy* **3**, 477–495 (Elsevier, 2012).
32. Perilla, J. R. & Gronenborn, A. M. Molecular Architecture of the Retroviral Capsid. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 410–420 (2016).
33. Pluta, K. & Kacprzak, M. M. Use of HIV as a gene transfer vector. *Acta Biochim. Pol.* **56**, 531–595 (2009).
34. Rocha-Sosa, M. El sistema ubiquitina/proteasoma en la interacción planta-patógeno. *Tip* **16**, 121–131 (2013).
35. Sultana, T., Zamborlini, A., Cristofari, G. & Lesage, P. Integration site selection by retroviruses and transposable elements in eukaryotes. *Nat. Rev. Genet.* **18**, 292–308 (2017).

36. Gaudin, C. *et al.* Structure of the RNA signal essential for translational frameshifting in HIV-1. *J. Mol. Biol.* **349**, 1024–1035 (2005).
37. Giedroc, D. P. & Cornish, P. V. Frameshifting RNA pseudoknots: Structure and mechanism. *Virus Res.* **139**, 193–208 (2009).
38. Mak, J. & De Marco, A. Recent advances in retroviruses via cryo-electron microscopy. *Retrovirology* **15**, 1–11 (2018).
39. Lundstrom, K. Latest development in viral vectors for gene therapy. *Trends Biotechnol.* **21**, 117–122 (2003).
40. Crespo-Barreda, A. *et al.* Viral and Nonviral Vectors for In Vivo and Ex Vivo Gene Therapies. *Transl. Regen. Med. to Clin.* 155–177 (2016). doi:10.1016/B978-0-12-800548-4.00011-5
41. Warnock, J. N., Daigre, C. & Al-Rubeai, M. Introduction to Viral Vectors. in **2**, 1–25 (2011).
42. Merten, O. W., Hebben, M. & Bovolenta, C. Production of lentiviral vectors. *Mol. Ther. - Methods Clin. Dev.* **3**, 16017 (2016).
43. Naldini, L. *et al.* In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science (80-)*. **272**, 263–267 (1996).
44. Sanber, K. S. *et al.* Construction of stable packaging cell lines for clinical lentiviral vector production. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
45. Walker, J. M. *Lentiviral Vectors and Exosomes as Gene and Protein Delivery Tools.* **1448**, (2016).
46. Sastry, L. *et al.* Certification assays for HIV-1-based vectors: Frequent passage of gag sequences without evidence of replication-competent viruses. *Mol. Ther.* **8**, 830–839 (2003).
47. Carpentier, D. C. J. *et al.* Enhanced pseudotyping efficiency of HIV-1 lentiviral vectors by a rabies/vesicular stomatitis virus chimeric envelope glycoprotein. *Gene Ther.* **19**, 761–774 (2012).
48. Hurst, T. P. & Magiorkinis, G. Epigenetic control of human endogenous retrovirus expression: Focus on regulation of long-terminal repeats (LTRs). *Viruses* **9**, 1–14 (2017).
49. Zufferey, R. *et al.* Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo

- gene delivery. *J. Virol.* **72**, 9873–80 (1998).
50. Walker, J. M. *Lentivirus Gene Engineering Protocols 2nd Edition.* (2010).
 51. Oka, Y. *et al.* 293FT cells transduced with four transcription factors (OCT4, SOX2, NANOG, and LIN28) generate aberrant ES-like cells. *J. Stem Cells Regen. Med.* **6**, 149–56 (2010).
 52. Gama-Norton, L. *et al.* Lentivirus Production Is Influenced by SV40 Large T-Antigen and Chromosomal Integration of the Vector in HEK293 Cells. *Hum. Gene Ther.* **22**, 1269–1279 (2011).
 53. Jensen, T. W., Chen, Y. & Miller, W. M. Small Increases in pH Enhance Retroviral Vector Transduction Efficiency of NIH-3T3 Cells. *Biotechnol. Prog.* **19**, 216–223 (2003).
 54. Denning, W. *et al.* Optimization of the transductional efficiency of lentiviral vectors: Effect of sera and polycations. *Mol. Biotechnol.* **53**, 308–314 (2013).
 55. Dong, H. *et al.* MicroRNA: Function, Detection, and Bioanalysis. *Chem. Rev.* **113**, 6207–6233 (2013).
 56. Wilson, D. E. & Chosewood, L. C. Biosafety in Microbiological and Biomedical Laboratories. *Public Heal. Serv. Centers Dis. Control Prev. Natl. Institutes Heal. HHS Publ. No. 21–1112* (2007).
 57. Cockrell, A. S. & Kafri, T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol. Biotechnol.* **36**, 184–204 (2007).
 58. de las Mercedes Segura, M., Kamen, A. & Garnier, A. Downstream processing of oncoretroviral and lentiviral gene therapy vectors. *Biotechnol. Adv.* **24**, 321–337 (2006).
 59. Karolewski, B. A., Watson, D. J., Parente, M. K. & Wolfe, J. H. Comparison of Transfection Conditions for a Lentivirus Vector Produced in Large Volumes. *Hum. Gene Ther.* **14**, 1287–1296 (2003).
 60. Reiser, J. Production and concentration of pseudotyped HIV-1-based gene transfer vectors. *Gene Ther.* **7**, 910–913 (2000).
 61. Baekelandt, V., Eggermont, K., Michiels, M., Nuttin, B. & Debyser, Z. Optimized lentiviral vector production and purification procedure prevents immune response after transduction of mouse brain. *Gene Ther.* **10**, 1933–1940 (2003).

62. Tang, Y., Garson, K., Li, L. & Vanderhyden, B. C. Optimization of lentiviral vector production using polyethylenimine-mediated transfection. *Oncol. Lett.* **9**, 55–62 (2015).
63. De Palma, M. & Naldini, L. [29] Transduction of a gene expression cassette using advanced generation lentiviral vectors. in *Methods in Enzymology* **346**, 514–529 (2002).

13 ANEXOS

ANEXO 1: Protocolo de transformación de bacterias quimiocompetentes *E. coli* One Shot® TOP10 con el vector pcDNAmiR-1270

1. Descongelar una alícuota de *E. coli* One Shot® TOP10 en hielo.
2. Añadir 2 µl del producto de ligación e incubar 30 minutos en hielo.
3. Dar choque térmico a 42°C por 30 segundos.
4. Incubar en hielo 2 minutos.
5. Adicionar 500 µl de medio SOC e incubar 1 hora a 37°C con agitación constante.
6. Plaqueo en cajas de agar LB con espectinomicina 50 µg/ml.
7. Incubación de placas toda la noche a 37°C.

ANEXO 2: Protocolo de extracción de plásmidos por lisis alcalina y purificación por columnas de matriz de sílice (ajuste del *Plasmid Midi kit Protocol*).

1. Alicuotar el medio incubado toda la noche en tubos cónicos de 50 ml y centrifugar a 8,000 rpm por 15 minutos para formar un botón de bacterias.
2. Resuspender las bacterias en 2 ml de amortiguador P1.
3. Añadir 2 ml de amortiguador P2, mezclar vigorosamente por inversión hasta que el color azul (dado por el indicador LyseBlue presente en el amortiguador P1) sea uniforme e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
4. Añadir 4 ml de amortiguador P3, mezclar vigorosamente por inversión hasta que el color azul desaparezca por completo e incubar en hielo por 15 minutos.
5. Centrifugar a 8,000 rpm por 1 hora a 4°C para formar un botón de desecho celular.
6. Colocar la columna Qiagen-tip en un tubo cónico de 15 ml que servirá como tubo colector.
7. Equilibrar la columna con 4 ml de amortiguador QBT y dejar que la columna se vacíe por gravedad.

8. Añadir el sobrenadante a la columna lentamente cuidando no deshacer el botón. Descargar el tubo colector cuando sea necesario.
9. Lavar la columna con 10 ml de amortiguador QC. Repetir una vez más.
10. Colocar la columna en un tubo cónico de 15 ml limpio.
11. Eluir el DNA con 5 ml de amortiguador QF.
12. Añadir 5 ml de isopropanol frío e incubar por 1 hora a -20°C.
*Por lo general, esta incubación se extendía por toda la noche y al día siguiente se continuaba con el protocolo.
13. Alicuotar en tubos de microcentrífuga de 2 ml y centrifugar a 13,000 rpm por 45 minutos para precipitar el DNA plasmídico.
14. Lavar los botones de DNA plasmídico con 500 µl de Etanol (EtOH) al 75% frío y centrifugar a 13,000 rpm por 15 minutos.
15. Decantar el sobrenadante y dejar secar los botones al aire (10 minutos aprox.)
16. Resuspender el DNA plasmídico en 200 µl totales de agua Milli-Q.

ANEXO 3: Protocolo seguido para la purificación de la digestión del pcDNAmiR-1270 con la enzima Spel. (ajuste del *MinElute® Reaction Cleanup kit Protocol*).

1. Añadir 300 µL de amortiguador ERC a los 50 µL de reacción enzimática.
2. Colocar una columna MinElute en un tubo colector de 2 ml
3. Para permitir la unión del DNA a la matriz de la columna transferir la mezcla (350 µL aprox.) a la columna y centrifugar por un minuto a 13,000 rpm.
4. Descargar el tubo colector y colocar nuevamente la columna.
5. Añadir 750 µl de amortiguador PE a la columna para lavar el DNA unido y centrifugar por un minuto a 13,000 rpm.
6. Descargar el tubo colector y colocar nuevamente la columna.
7. Centrifugar por un minuto a 13,000 rpm para eliminar el etanol residual contenido en el amortiguador PE.
8. Descargar el tubo colector y colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio.

9. Eluir el DNA añadiendo 20 μ l de Agua Milli-Q y centrifugando por un minuto a 13,000 rpm.

* Todos los amortiguadores utilizados son parte del *MinElute® Reaction Cleanup kit*

ANEXO 4: Protocolo de transformación de bacterias *E. coli* One Shot® Stbl3™ con el vector pLentimiR-1270

1. Descongelar una alícuota de *E. coli* One Shot® Stbl3™ (*BLOCK-iT™ Lentiviral Pol II miR RNAi Expression System kit*) en hielo.
2. Añadir 2 μ l del producto recombinación LR e incubar 30 minutos en hielo.
3. Dar choque térmico a 42°C por 30 segundos.
4. Incubar en hielo 2 minutos.
5. Adicionar 500 μ l de medio SOC e incubar 1 hora a 37°C con agitación constante.
6. Plaqueo en cajas de agar LB con ampicilina 100 μ g/ml.
7. Incubación de placas toda la noche a 37°C.

ANEXO 5: Transformación de bacterias quimiocompetentes.

1. Empastillar aprox. 2 ml totales de cultivo bacteriano en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml (centrifugar a 6,000 rpm por 5 minutos).
2. Añadir 150 μ l de solución de resuspensión adicionada con RNAsa. (Tris-Cl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM, RNasa A 100 μ g/7ml) almacenada a 4°C.
3. Resuspender el botón bacteriano.
4. Agregar 150 μ l de solución de lisis (NaOH 200 mM, 1% SDS) almacenada temperatura ambiente y mezclar por inversión 5-6 veces.
5. Incubar a temperatura ambiente por 4 minutos.
6. Añadir 150 μ l de solución de neutralización (Acetato de potasio 3 M, 110 ml ácido acético glacial, pH 5.5) almacenada a 4°C. y mezclar por inversión 5-6 veces.
7. Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos.
8. Centrifugar a 13,000 rpm durante 15 minutos a 4°C para formar un botón de desecho bacteriano.
9. Recuperar el sobrenadante en un tubo de microcentrífuga limpio.

10. Añadir 450 µl de EtOH absoluto frío y mezclar por inversión 5-6 veces.
11. Incubar a -20°C por 20 minutos.
12. Centrifugar a 13,000 rpm durante 25 minutos a 4°C para formar un botón de DNA plasmídico.
13. Desechar el sobrenadante cuidando no despegar el botón.
14. Agregar 750 µl de EtOH al 75% frío y mezclar por inversión 5-6 veces.
15. Centrifugar a 13,000 por 10 minutos a 4°C.
16. Desechar el sobrenadante cuidando no despegar el botón.
17. Dejar secar el botón de DNA al aire.
18. Resuspender el DNA en 50 µl de agua Mili-Q.

ANEXO 6: Protocolo para la transfección de las 3 clonas de pLentimiR-1270.

1. En una placa para cultivo celular de 12 pozos sembrar aprox. 120,000 células por pozo en 1 ml de medio DMEM con SFB 10% e incubar toda la noche.
2. Al día siguiente, preparar dos tubos de 2 ml para cada reacción a realizar: colocar en cada tubo lo siguiente
 - a. 500 µl de Opti-MEM® (*Opti-MEM® I (1x). Reduced Serum Medium. Gibco™. Cat. 31985-070. Lote 1929947*) + 2 µl de Lipofectamine®2000
 - b. 500 µl de Opti-MEM® + 1 µg DNA
3. Dejar reposar los tubos por 5 minutos.
4. Transferir el contenido del tubo b al tubo a y dejar reposar la mezcla por 30 minutos para permitir la formación de estructuras auto ensambladas (liposomas) cargadas de DNA plasmídico.
5. Retirar el medio DMEM a las células.
6. Añadir la mezcla de reacción por goteo con ayuda de una micropipeta al pozo correspondiente. No dejar caer las gotas desde muy arriba, de lo contrario las células podrían despegarse.
7. Incubar las células con la mezcla de reacción por 5 horas. En este punto se lleva a cabo la fusión de los liposomas con la membrana lipídica de las células liberando dentro de ellas el DNA plasmídico.

8. Pasadas las 5 horas, retirar el medio de transfección y agregar 1 ml de medio DMEM con SFB 10%.
9. Incubar toda la noche.
10. 24 horas después de la transfección observar las células en el simulador de microscopio invertido EVOS™ (*EVOS™ FL Color Imaging Systems*. Invitrogen, Thermo Fisher. Cat. No. AMEFC4300. <https://www.thermofisher.com>) bajo el filtro GFP para la detección del gen reportero, la EmGFP.

ANEXO 7: Protocolo para la co-transfección de células 293FT. Plásmidos correspondientes a los sistemas de segunda y tercera generación.

Protocolo inicial de co-transfección.

1. En una placa para cultivo celular de 10 cm sembrar aprox. 5×10^6 células por pozo con 10 ml de medio DMEM adicionado con SFB 10%, Pen-Strep 100 U/mL y 0.1 mg/mL de piruvato de sodio (medio DMEM*) e incubar toda la noche.
2. Al día siguiente, preparar dos tubos de reacción para cada sistema; añadir 1.5 ml de medio Opti-MEM® a cada tubo y posteriormente etiquetarlos de manera que se pueda distinguir entre ellos y colocar en cada uno los reactivos de la tabla 10 en la cantidad indicada (sección 7.6.1), según corresponda.
3. Dejar reposar los tubos por 5 minutos.
4. Transferir el contenido del tubo A al tubo B y dejar reposar la mezcla por 30 minutos para permitir la formación de estructuras de auto ensamblaje (liposomas) cargadas de DNA plasmídico.
5. Retirar el medio DMEM* a las células.
6. Añadir la mezcla de reacción deslizando el contenido suavemente por las paredes cuidando no tocar el borde de la placa con la punta de la pipeta. Una vez añadido todo el contenido, deslizar suave y lentamente los tres ml totales de reacción por toda la placa de manera que la monocapa de células se humedezca con esta por completo. Cuidar que toda la superficie de la placa se encuentre húmeda; de ser necesario, añadir de 0.5 a 1 ml más de Opti-MEM® hasta mojar la monocapa de células por completo.

7. Incubar las células con la mezcla de reacción por 5 horas. En este punto se lleva a cabo la fusión de los liposomas con la membrana lipídica de las células liberando dentro de ellas el DNA plasmídico.
8. Pasadas las 5 horas, retirar el medio de co-transfección y realizar dos lavados con 5 ml de PBS estéril (*Dulbecco's Phosphate Amortiguadored Saline*. Gibco™. Ref. 31985-070. Lote 1929947).
9. Agregar 8 ml de medio DMEM* fresco e incubar toda la noche.
10. Después de 24 horas de la transfección observar las células en el simulador de microscopio invertido EVOS™ bajo el filtro GFP para la detección del gen reportero, la EmGFP.

ANEXO 8: Protocolo de cosecha de vectores lentivirales

Pasadas las 24 h de transfección, se verifica la presencia de efecto citopático y la expresión del gen reportero en las células tratadas. Si se observa un porcentaje de células transfectadas mayor a 70%, se procede a realizar la primera colecta de vectores lentivirales.

1. Etiquetar un tubo cónico de 15 mL para cada sistema y colocarlo en hielo.
2. Tomar con una jeringa sin aguja el sobrenadante de la placa cuidando no tocar las paredes ni la membrana de células, ladeando suavemente la placa cuando el volumen haya disminuido demasiado. Pasar el sobrenadante por un filtro de jeringa de 0.45 µm y colectarlo en el tubo etiquetado correspondiente.
3. Añadir 8 mL de medio fresco e incubar nuevamente las células por 24 h más.
4. Guardar el sobrenadante colectado a las 24 h a -70°C.
5. A las 48 h de la co-transfección, etiquetar un tubo cónico de 15 ml para cada sistema y colocarlo en hielo.
6. Con ayuda de una micropipeta tomar el sobrenadante y dejarlo caer sobre la membrana de células para despegarlas de la placa teniendo cuidado de no salpicar el líquido. Pipetear varias veces sin salpicar intentando lisar las células por acción mecánica.

7. Pasar el sobrenadante con las células despegadas por un filtro de jeringa de 0.45 μm con la misma técnica utilizada a las 24 h y colocarlo en el tubo correspondiente.
8. Guardar el sobrenadante colectado a las 48 h a -70°C .

ANEXO 9: Protocolo de infección de células 293FT con diluciones sucesivas de la cosecha lentiviral.

1. Para el caso de las cosechas que se encontraban congeladas, colocarlas en hielo y permitir que se descongelen paulatinamente, no utilizar ningún otro medio para acelerar el proceso de descongelación.
2. Preparar, en frío y en tubos correctamente etiquetados, diluciones sucesivas de la cosecha a probar en medio DMEM^x -o medio DMEM^x-HEPES dependiendo del experimento del que se trate- considerando concentraciones en un rango de 10^{-1} a 10^{-7} . Aunque para los primeros experimentos, la dilución menor fue de 1:2 debido a la baja concentración de Lentivirus que se obtenía de las cosechas.
3. En cada pozo colocar 1 ml de la dilución correspondiente. Dejar incubar en condiciones normales.
4. Inactivar el sobrante de cada dilución y desechar como RPBI al igual que todo el material desechable que estuvo en contacto con el sobrenadante.
5. Incubar las placas toda la noche en condiciones normales. A las 24, 48 y 72 h observar las células en el EVOS. Se busca obtener señal de la EmGFP en aproximadamente el 30% de las células totales en alguna dilución para proceder con el cálculo del título lentiviral.

ANEXO 10: Protocolo de cosecha y concentración de vectores lentivirales.

1. A las 24 h de la co-transfección, etiquetar 7 microtubos de 1.5 mL para cada sistema y colocarlos en hielo.
2. Tomar con una jeringa sin aguja el sobrenadante de la placa cuidando no tocar las paredes ni la membrana de células, ladeando suavemente la placa cuando el volumen haya disminuido demasiado. Pasar el

- sobrenadante por un filtro de jeringa de 0.45 μm y alicuotar 1 mL en cada uno de los tubos etiquetados correspondientes.
3. Añadir 8 mL de medio fresco e incubar nuevamente las células por 24 h más.
 4. Centrifugar los tubos de microcentrífuga a 14000 rpm por 2 h a 4°C para formar un botón de partículas virales.
 5. Decantar el sobrenadante en un recipiente con hipoclorito de sodio al 5% y añadir 100 μL de medio DMEM^x (medio DMEM adicionado con SFB 10% y Pen-Strep 100 U/mL; sin piruvato de sodio)-HEPES fresco a cada tubo.
 6. Dejar reposar los tubos a 4°C por 24 h permitiendo la resuspensión suave de las partículas virales.
 7. A las 48 h de la co-transfección, etiquetar 7 microtubos de 1.5 mL para cada sistema y colocarlos en hielo.
 8. Tomar con una jeringa sin aguja el sobrenadante de la placa cuidando no tocar las paredes ni la membrana de células, ladeando suavemente la placa cuando el volumen haya disminuido demasiado. Pasar el sobrenadante por un filtro de jeringa de 0.45 μm y alicuotar 1 mL en cada uno de los tubos etiquetados correspondientes.
 9. Centrifugar los microtubos a 14000 rpm por 2 h a 4°C para formar un botón de partículas virales.
 10. Decantar el sobrenadante en un recipiente con hipoclorito de sodio al 5% y añadir 100 μL de medio DMEM^x-HEPES fresco a cada tubo.
 11. Dejar reposar los tubos a 4°C por 24 h permitiendo la resuspensión suave de las partículas virales.
 12. Con ayuda de una micropipeta tomar el contenido de cada uno de los tubos, subiendo el líquido y bajándolo lentamente intentando resuspender las partículas que aún se encuentren precipitadas.
 13. Juntar el contenido de los 14 tubos de un mismo sistema en un mismo tubo para tener 1.4 mL de cosecha concentrada.
 14. Almacenar a 4°C hasta que se realice el protocolo de infección. No debe transcurrir más de una semana.