

00551



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
Universidad Nacional Autónoma de México

UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**ESTUDIO DEL ENSAMBLAJE DE PSEUDO-
PARTICULAS VIRALES DE ROTAVIRUS EN EL
SISTEMA DE CELULAS DE INSECTO-
BACULOVIRUS**

T E S I S

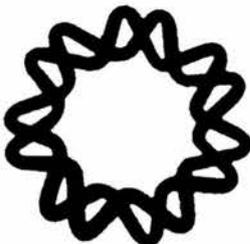
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

P R E S E N T A

I.Q. JIMMY ALEXANDER MENA MENDEZ

Cuernavaca, Morelos.

2004





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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Yimy Alexander

Alonso Alvarado

FECHA: 2/03/04

FIRMA: 

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera en el Laboratorio del Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo del Sistema Nacional de Investigadores Expediente 8735, de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del proyecto DGAPA-IN-218202 y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto CONACYT NC-230.

El universo no me es suficiente para definirte.

Ni tampoco mi mente logra abstraerte.

Solo mi corazón puede sentirte.

Solo mi alma logra verte.

Te amo Ingrid

Jimmy

Dedicado a todos aquellos que han quedado en este camino de la vida. Aquellos que he conocido y admirado. Jaime Méndez (1984), Reynaldo Mendoza (1995), Diego Chico (2003).

Dedicado a todos aquellos que aún siguen en el camino, luchando día a día por un poco de verdad, justicia y dignidad. Aquellos que me han enseñado el significado del amor, la lucha y el tesón en el cual se forjan los grandes seres humanos. Aquellos que escogieron el camino de la ayuda a los demás. Jonny Mena, a ti hermano. Aurora Méndez de Mena, a ti madre. Sofonias Mena Mena, a ti padre. A mi familia y a mi nueva familia Lozada Mena.

Dedicado a todos aquellos que buscan la verdad y el conocimiento tanto en la naturaleza como en los hombres. Que respetan el arte y la ciencia como el alma y la humanidad. Tanto en el universo como en la tierra. Dedicado a todos aquellos mentores de mi formación intelectual y académica. Dr. Luis A. Caicedo, Dr. Carlos O. Duque, Ms.C. Rubén Darío Godoy, Ms.C. Claudia Berdugo. Y mas aun dedicado a aquellos que creyeron en mí y mis palabras: Dra. Laura Alicia Palomares y Dr. Octavio T. Ramírez.

Dedicado a todos aquellos que caminan a mi lado. Aquellos amigos que se forjan en el calor de la lucha, en el sinsabor de la derrota, en las mieles de la gloria. Aquellos amigos, Adrián Delgado, Argel Gastelum, Karina Balderas, Vanesa López, Andrés Saralegui, Juan Carlos Pérez Monter, Pavelovich, Vizcayo, Rol.

Dedicado a aquellos luchadores del respeto a la dignidad humana, Soldado Cathay Williams, Soldado William H. Carney, Dr. Martín Luther King, Nelson Mandela, mineros chocoanos, Dellia Zapata.....

“Yo deseo que hoy se prueben a si mismos. Los ojos de miles los estarán mirando esta noche”

Coronel Shaw. 54TH de Massachusetts. Fort Wagner. 1863.

Agradecimientos

A la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera por su apoyo incondicional, tanto en lo personal, como en lo académico. Por su tiempo, paciencia, cuidado y confianza. El tiempo y la suerte se confabularon para poder ser su estudiante. Gracias

Al Dr. Octavio T. Ramírez que fue impulso, fuerza, conocimiento, verdad y justicia.

A Dr. Enrique Rudiño, que fue apoyo, animo y aportes.

A Dra. Susana López, que fue reto, ímpetu y experiencia.

A los miembros del Jurado, por su interés y comentarios

Dra. Laura A. Palomares Aguilera

Dr. Carlos Arias Ortiz

Dr. Marco Rito-Palomares

Dra. Rosana Sánchez López

Dr. Roberto Stock Silberman

Gracias a Dr. Sandino Estrada, Karin Levy, Antonio Serrato, Argel Gastelum, Adrián Delgado, Mauricio Trujillo, Rubén Priego, Lucio Rodríguez, Heber Gamboa, Edith Coronado, Vanesa López, Vanessa Hernández, Javier Dorantes, Karina Balderas, Dr. Tomas López, Mauricio Realpe, Rafaela Espinosa, la unidad de microscopia confocal, la unidad de microscopia electrónica, Dr. Stock y los miembros del grupo Tonatiuh y grupo Galindo.

TABLA DE CONTENIDOS

Indice de Figuras	iii
Indice de Tablas	v
Nomenclatura	vi
Resumen	1
1. Introducción	3
2. Antecedentes	5
2.1. Pseudo-Partículas Virales (PPV's)	5
2.1.1. Utilidad de las Pseudo-Partículas Virales como vacunas	5
2.1.2. Mecanismo de ensamblaje de Pseudo-Partículas Virales	7
2.1.3. Rotavirus. Estructura y morfología	9
2.1.4. Expresión de PPV's en sistemas recombinantes	12
2.2. Sistema Células de Insecto-Baculovirus (CI-BV)	14
2.2.1. Baculovirus	14
2.2.2. Células de insecto	17
2.2.3. Parámetros del sistema CI-BV. Multiplicidad de infección, Tiempo de infección	18
2.2.4. Expresión de PPV's en el sistema CI-BV	20
3. Objetivos	23
3.1. Objetivo general	23
3.2. Objetivos específicos	23
4. Materiales y Métodos	24
4.1. Línea celular	24
4.2. Medio de cultivo	24
4.3. Baculovirus recombinante	25
4.4. Cultivos de células en suspensión	25
4.5. Métodos analíticos	26
4.5.1. Determinación de concentración, tamaño y viabilidad celular	26
4.5.2. Cuantificación de VP6 y GFPVP2	26

4.5.3. Cuantificación <i>in vivo</i> de GFPVP2	27
4.5.4. Purificación e identificación de pseudo-partículas virales	28
4.5.5. Caracterización y cuantificación de PPV's por HPLC	28
4.6. Inmunofluorescencia	29
4.7. Microscopía electrónica	30
4.8. Consideraciones matemáticas	30
4.8.1. Cálculo de la velocidad específica de producción de proteína	30
5. Resultados y discusión	32
5.1. Nuevo método de titulación de baculovirus recombinantes. Artículo "Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay"	32
5.2. Localización celular de proteínas estructurales de rotavirus en CI-BV	36
5.2.1. Localización de VP6	36
5.2.2. Localización de GFPVP2 y VP2	40
5.2.3. Localización celular de VP6 y GFPVP2 en coinfecciones	43
5.3. Cinéticas de producción de proteínas estructurales de rotavirus	46
5.3.1. Cuantificación <i>in vivo</i> de GFPVP2	47
5.3.2. Cinéticas de producción de GFPVP2	50
5.3.3. Cinéticas de producción de VP6	56
5.3.4. Comparación en la producción de GFPVP2 y VP6 a diferentes MDI	60
5.4. Caracterización, cuantificación y purificación de PPV's por cromatografía líquida	64
5.4.1. Caracterización de PPV's de rotavirus por cromatografía líquida	65
5.4.2. Cuantificación de PPV's de rotavirus por cromatografía líquida	69
5.4.3. Purificación de PPV's de rotavirus por cromatografía líquida	72
6. Conclusiones	74
7. Perspectivas	76
8. Bibliografía	77

INDICE DE FIGURAS

Figura 2.1	Pseudo-partícula viral de virus de simio SV40	6
Figura 2.2	Estructura de rotavirus	11
Figura 2.3	Baculovirus	15
Figura 2.4	Ciclo viral del baculovirus en la célula de insecto	16
Figura 2.5	Distribución de Poisson	19
Figura 5.1	Inmunofluorescencia de células High Five™ infectadas con bac VP6	37
Figura 5.2.	Inmunofluorescencia contra VP6 en células infectadas con bac VP6 a MDI de 5 ufp/célula	38
Figura 5.3.	Localización de VP6 y Tubulina	39
Figura 5.4.	Formación de microtúbulos y polimorfismo de VP6	40
Figura 5.5.	Localización celular de GFPVP2	41
Figura 5.6.	Células High Five™ infectadas con bac VP2 o bac GFPVP2 a MDI 5 ufp/célula	42
Figura 5.7.	Cortes sagitales de células High Five™ expresando VP2 o GFPVP2	43
Figura 5.8.	Localización de VP6 en células High Five™ coinfectadas con bac VP6 y bac VP2 a MDI 5 ufp/célula	44
Figura 5.9.	Cortes sagitales de células High Five™ coinfectadas con bac VP6 y bac VP2 a MDI 5 ufp/célula	44
Figura 5.10.	Células High Five™ coinfectadas con bac VP6 y bac GFPVP2 a MDI 5 ufp/célula de cada virus	45
Figura 5.11.	Espectro de excitación y emisión de EGFP	47
Figura 5.12.	Curva de calibración de EGFP	48
Figura 5.13.	Espectro de emisión para la cuantificación <i>in vivo</i> de GFPVP2	49
Figura 5.14.	Cinética de crecimiento típica de células High Five™	51
Figura 5.15.	Cinética de crecimiento de células High Five™ infectadas con bac GFPVP2 a diferentes MDI	53
Figura 5.16.	Efecto de la MDI en la producción de GFPVP2	54

Figura 5.17. Degradación proteolítica de la proteína GFPVP2 en células de insecto	55
Figura 5.18. Cinética de crecimiento de células High Five™ infectadas con bac GFPVP2 a diferentes MDI	57
Figura 5.19. Efecto de la MDI en la producción de VP6	58
Figura 5.20. Distribución de proteína VP6 en sobrenadante y pellet celular en células High Five™ infectadas a MDI 5 ufp/célula	59
Figura 5.21. Relación entre la MDI y concentración máxima de proteína	61
Figura 5.22. Máxima velocidad específica de producción de proteína a diferentes MDI	63
Figura 5.23. Análisis de bandas obtenidas en gradiente de CsCl	66
Figura 5.24. Micrografías electrónicas de 2/6 PPV's	66
Figura 5.25. Cromatograma de B1 por HPLC-GP	67
Figura 5.26. Análisis de picos del cromatograma de B1	68
Figura 5.27. Análisis de B1, B2 y B3 por HPLC-GP	69
Figura 5.28. Curva de calibración en HPLC-GP de EGFP	70
Figura 5.29 Análisis de las diferentes bandas obtenidas del sobrenadante celular	71
Figura 5.30. Perfil cromatográfico de 2/6 PPV's purificadas por CsCl. Columnas Ultrahydrogel 500 y 2000 en serie	73

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1. Proteínas estructurales de rotavirus	9
Tabla 2.2. Pseudo-partículas virales expresadas en diferentes sistemas.	13
Tabla 4.1. Principales componentes del medio SF-900II	24
Tabla 4.2. Baculovirus recombinantes utilizados	25
Tabla 4.3. Anticuerpos utilizados	29

NOMENCLATURA

2 PPV	Pseudo-partícula viral formada por VP2
2/6 PPV	Pseudo-partícula viral formada por VP2 y VP6
2/6/7 PPV	Pseudo-partícula viral formada por VP2, VP6 y VP7
2/6/7/4 PPV	Pseudo-partícula viral formada por VP2, VP6, VP7 y VP4
255/6	Anticuerpo monoclonal de ratón anti VP6
8A2	Anticuerpo monoclonal de ratón anti VP2
a	Absorbancia máxima
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> multinuclearpoliedrovirus
b	Pendiente
B1	Banda 1 del gradiente de CsCl
B2	Banda 2 del gradiente de CsCl
B3	Banda 3 del gradiente de CsCl
bac GFPVP2	Baculovirus que codifica para la proteína GFPVP2
bac VP2	Baculovirus que codifica para la proteína VP2
bac VP6	Baculovirus que codifica para la proteína VP6
CI-BV	Sistema de Células de Insecto-Baculovirus
D	Dilución
D ₀	Dilución al 50% de respuesta
EGFP	Enhanced Green Fluorescent Protein
GFP	Green Fluorescent Protein
GFPVP2	Proteína de fusión entre GFP y VP2
h.p.i.	Horas post-infección
HPLC-GP	Cromatografía Líquida de Alta Resolución de Permeación en Gel
IBDV	Virus de la enfermedad infecciosa bursal
MDI	Multiplicidad de Infección
MOI	Multiplicity of infection
PPV's	Pseudo-Partículas Virales
RF	Cepa de rotavirus (mono)
SA-11	Cepa de rotavirus (bovino)

Sf21	Línea celular de <i>Spodoptera frugiperda</i>
Sf9	Línea celular de <i>Spodoptera frugiperda</i>
TCID ₅₀	Tissue Culture Infectious Dose
TCLD ₅₀	Tissue Culture Lethal Dose
TDI	Tiempo de Infección
Tn 5B1-4	Línea celular de <i>Trichoplusia ni</i>
UA	Unidades Arbitrarias
ufp	Unidades Formadoras de placa
URF	Unidades relativas de fluorescencia
VP2	Proteína Viral 2
VP4	Proteína Viral 4
VP6	Proteína Viral 6
VP7	Proteína Viral 7
X _T	Células Totales
X _v	Células Viables
Y	Absorbancia
Y ₀	Absorbancia mínima
YM	Anticuerpo policlonal de conejo anti-proteínas estructurales de rotavirus

Letras Griegas

α	Fase temprana inmediata
β	Fase temprana
γ	Fase tardía
δ	Fase muy tardía
μ	Velocidad específica de crecimiento

RESUMEN

El sistema de expresión células de insecto-baculovirus (CI-BV) es el más utilizado en la producción de Pseudo-Partículas Virales (PPV's). Las PPV's son estructuras recombinantes similares a los virus nativos pero sin material genético. En el sistema CI-BV se han expresado gran variedad de PPV's con el objetivo de estudiar su potencial inmunológico para ser utilizadas como vacunas. Rotavirus es causante de la diarrea infantil aguda y por lo tanto es de interés obtener una vacuna contra este virus a partir de PPV's. La cápside viral de rotavirus consta de 4 proteínas estructurales (VP2, VP6, VP7 y VP4). Esta cápside está formada por tres capas proteicas: la capa interna por VP2, la capa intermedia por VP6 y la capa externa por VP7. La proteína VP4 forma espículas alrededor de la cápside. Diferentes estudios de laboratorio han reportado que las PPV's formadas por las proteínas estructurales (todas o algunas de las proteínas), producen una respuesta inmunológica igual o mayor a la generada por el virus nativos. Sin embargo, la producción de PPV's de rotavirus es compleja y dista de ser eficiente. Con el objetivo de desarrollar estrategias racionales y eficientes de producción, este estudio se enfocó en la producción de las PPV's de rotavirus conformadas por las proteínas VP2 y VP6 en el sistema CI-BV. El primer enfoque fue a nivel celular, donde se determinó el patrón de localización de las proteínas estructurales cuando se expresaron independientemente. La proteína VP6 se polimerizó en forma de túbulos que no colocalizaron con tubulina y la proteína GFPVP2 se localizó en forma de gránulos asociados a estructuras membranales. Este patrón de localización cambió cuando se coexpresaron ambas proteínas y VP6 pasó de un patrón fibrilar a la formación de gránulos dispersos por el citoplasma y además estos gránulos colocalizaron con la proteína GFPVP2. Este resultado indicaría que las proteínas sí interactúan para la conformación de las PPV's en el interior de la célula y que probablemente es necesario que ambas proteínas se expresen en cada célula para el ensamblaje de las PPV's. El segundo enfoque fue el análisis de la influencia de la multiplicidad de infección (MDI) de los baculovirus bac

GFPVP2 y bac VP6 sobre la concentración y velocidad de producción de las proteínas estructurales (GFPVP2 y VP6). Se observó que MDI entre 1 y 10 ufp/célula no tienen un efecto significativo sobre la concentración máxima de GFPVP2 (1190 ± 44 ng/mL), pero si se observó una relación entre la MDI y la velocidad de producción obteniéndose la velocidad máxima de producción (50 ng/ 10^6 cel*h) a 20 ufp/célula. En contraste, en la producción de VP6, existió una relación inversamente proporcional entre la MDI y la concentración máxima. En lo que respecta a la velocidad específica de producción se observó una velocidad máxima (25 UA/ 10^6 cel*h) a MDI 5 ufp/célula. Esta relación entre MDI y la velocidad de producción permitirá modular la expresión de las proteínas estructurales para optimizar el ensamblaje de la 2/6 PPV's (formada por las proteínas GFPVP2 y VP6). Por ultimo con el fin de desarrollar técnicas cuantitativas con respecto a las generalmente utilizadas, se obtuvo un método de titulación de baculovirus, que resultó útil, rápido y objetivo, más aun cuando no se tiene un baculovirus con un gen reportero. Esta metodología fue reportada en una revista arbitrada con difusión internacional. La otra metodología desarrollada fue la implementación de la cromatografía líquida de permeación en gel (HPLC-GP) para el análisis y cuantificación de PPV's. Gracias a esta metodología ahora será posible monitorear cuantitativamente la producción de PPV's en cinéticas de producción y de esta forma será posible estimar la eficiencia del ensamblaje mediante la manipulación de la MDI. Y este es el primer trabajo que implementa una técnica cromatográfica para la cuantificación de PPV's de rotavirus.

1. INTRODUCCION

Una de las formas de prevención de diferentes enfermedades infecciosas es la vacunación. El enfoque tradicional de obtención de vacunas a partir de virus atenuados o inactivados tiene la desventaja de una posible infección por una atenuación o inactivación deficientes. Por lo tanto nuevos caminos se están siguiendo: Uno de ellos es la preparación de forma recombinante de estructuras similares a las cápsides de los virus. Estas estructuras (conocidas como PPV's) están conformadas por las proteínas que forman la estructura del virus nativo, pero no contienen genoma, lo que evita el peligro de infección. La expresión recombinante abre la posibilidad de expresar las cápsides de diferentes virus, así como ensayar el potencial inmunológico de diferentes estructuras. Las cápsides virales pueden estar conformadas por más de una capa proteica y algunas dan respuestas inmunes mayores que otras. Las PPV's han demostrado a nivel de laboratorio que pueden ser excelentes vacunas. Por ejemplo, la vacuna contra Hepatitis B es una PPV (Thomas *et al.*, 2000).

A nivel de laboratorio la producción de estas estructuras se hace en diferentes sistemas de expresión (bacterias, levaduras, células de mamífero y células de insecto) cada cual con sus pro y contras. El más difundido y versátil es el sistema de células de insecto-baculovirus (CI-BV). Este sistema consiste en utilizar un baculovirus recombinante (vector), que codifica para una o más de las proteínas estructurales, e infectar células de insecto (huésped). Es en la célula de insecto donde se expresan las proteínas estructurales. Este sistema lleva consigo una serie de factores que pueden ser optimizados para obtener el mayor rendimiento posible. Además de los parámetros intrínsecos del sistema de CI-BV, la producción de PPV's conlleva la complejidad del proceso de ensamblaje de estructuras virales, por lo tanto su entendimiento se traducirá en el desarrollo de estrategias eficientes de producción de pseudo-partículas virales.

El siguiente trabajo aporta información sobre el proceso de producción y ensamblaje de PPV's en el sistema CI-BV. Este estudio se enfocó en la

producción de PPV's desde tres perspectivas diferentes: i) El estudio de la distribución intracelular de las proteínas estructurales. ii) El comportamiento cinético y la influencia de la multiplicidad de infección en la producción de las subunidades formadoras de la estructura viral. iii) El estudio, desarrollo y utilización de técnicas analíticas de separación y cuantificación de PPV's, con vistas a un proceso eficiente de producción.

2. ANTECEDENTES

2.1. Pseudo-Partículas Virales (PPV's)

Los virus en la naturaleza protegen su material genético con una capa proteica llamada cápside. Esta capa se encarga de preservar la integridad del ADN o ARN viral en las condiciones medio ambientales y es removida parcial o totalmente en el momento en que el virus penetra en su huésped y empiezan los procesos de traducción, transcripción y replicación del virus. Aproximadamente el 50% de las cápsides de los virus hasta ahora descubiertos, son estructuras con geometría icosaédrica (Zlotnick *et al.*, 2000). Estas estructuras icosaédricas pueden variar en diámetro desde 20 nm hasta 150 nm. Las cápsides virales pueden estar conformadas por múltiples copias de una misma proteína o por más de una proteína. Además, pueden consistir de una sola capa proteica o múltiples capas proteicas. Las proteínas estructurales se ensamblan o polimerizan de una forma estructurada, dando lugar a arquitecturas definidas. Algunas de estas proteínas, dadas las condiciones necesarias (cantidad mínima de proteína, pH, fuerza iónica, etc.) sorprendentemente pueden auto-ensamblarse para dar lugar a estructuras similares a la cápside viral nativa, pero con la diferencia de que no poseen material genético. Estas cápsides virales son llamadas pseudo-partículas virales (PPV's) (Tsao *et al.*, 1996; Newcomb *et al.*, 1994; Newcomb *et al.*, 1996; Hu y Bentley, 2001; Palomares *et al.*, 2002; Zlotnick y Stray, 2003) (**Figura 2.1**).

2.1.1. Utilidad de las Pseudo-Partículas Virales como vacunas.

Debido su composición proteica y similaridad estructural con los virus nativos, se ha planteado la utilidad de las PPV's como vacunas potenciales, gracias a que pueden desencadenar una respuesta inmune en el huésped sin el riesgo del virus nativo, ya que al no contener material genético no es posible la replicación del virus (O'Neal *et al.*, 1997).

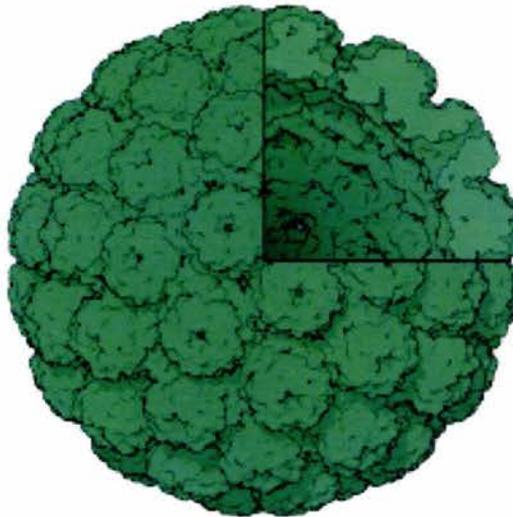


Figura 2.1. Pseudo-partícula viral de virus de simio SV40. (Tomado del Protein Data Bank, www.rcsb.org/pdb).

La utilidad de las PPV's como vacunas ya ha sido demostrada. La actual vacuna contra hepatitis B es una PPV de 22 nm de diámetro formada por la proteína HBsAg (antígeno de superficie de hepatitis B) (Thomas *et al.*, 2000).

Existen varios reportes sobre la respuesta inmunológica (en diferentes modelos biológicos) desencadenada por PPV's de diferentes virus. Jiang *et al.* (2002) reportaron que mediante la administración de PPV's del virus Norwalk (causante de gastroenteritis aguda) a humanos se producían altos niveles de anticuerpos en proporción similar a los obtenidos por la infección del virus nativo. Este nivel de respuesta inmunológica también se observó en otros modelos animales (cerdos y conejos). Esto se explica porque la estructura de las PPV's es idéntica a la del virus nativo.

Goldman *et al.* (1999) estudiaron la respuesta inmune y la posible utilización de PPV's de un poliomavirus de humano para estudios terapéuticos, de diagnóstico y como posible vehículo para terapia génica. Sus estudios revelaron que el ensamblaje de la proteína estructural VP1 resultaba en una estructura esférica de 55 a 60 nm de diámetro, exhibiendo la morfología típica del poliomavirus. También la aplicación intramuscular (en ratones) de las PPV's purificadas resultó en una

producción de IgG altamente reactivas y específicas hacia las PPV's. A su vez, se observó la capacidad de adherencia de las PPV's a diferentes líneas celulares. Los resultados demostraron igual o mayor capacidad de adherencia a diferentes líneas celulares en comparación con el virus nativo. La adherencia a células y la posibilidad de desensamblar y re-ensamblar las PPV's para que contengan material genético foráneo, las han colocado como posibles vectores en terapia génica.

En lo que respecta a rotavirus, las PPV's han sido utilizadas para evaluar la respuesta inmunológica en ratones y conejos. Ciarlet *et al.* (1998) observaron que la administración oral de PPV's de rotavirus a conejos indujo niveles mayores de anticuerpos (IgG, IgA e IgM) específicos para rotavirus, en comparación con la inoculación con cepas inactivadas del virus. Además esta respuesta inmune protegió (87-100%) a los conejos que posteriormente fueron retados con cepas activas de rotavirus. A su vez, Fromantin *et al.* (2001) evaluaron la respuesta inmune de las PPV's de rotavirus mediante administración nasal en ratones. Los resultados obtenidos muestran niveles de IgG e IgA similares a los obtenidos por administración oral.

Estos estudios inmunológicos también se han llevado a cabo con PPV's de Hepatitis B, parvovirus y enfermedad infecciosa bursal. Estas investigaciones apoyan la potencial utilidad y eficacia de las PPV's como vacunas (Rueda *et al.*, 2001; Takehara *et al.*, 1988; Lee *et al.*, 2003).

2.1.2. Mecanismo de ensamblaje de Pseudo-Partículas Virales.

Existen varios reportes sobre la capacidad de auto-ensamblaje de las PPV's. Desde el punto de vista ingenieril este aspecto es relevante ya que lo que se desea es obtener la mayor cantidad de PPV's bien estructuradas, porque su capacidad inmunológica depende de su estructura (Tleugabulova *et al.*, 1999). El ensamblaje de las PPV's es un proceso regulado por diferentes factores y que tiene también diferentes estadios.

La cápsides virales se ensamblan bajo ciertas condiciones que propician la interacción entre las proteínas y mantienen estas interacciones estables. Estas interacciones son las fuerzas de Van der Waals, los puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y puentes de disulfuro. Estas interacciones son dependientes del pH, fuerza iónica, potencial redox, concentración de ciertos iones quelantes. McCarthy *et al.* (1998) reportaron que para el ensamblaje *in vitro* de la cápside de papilomavirus (tipo 11, proteína estructural L1), era necesario una fuerza iónica y potencial redox óptimos (500 mOsM) para favorecer el ensamblaje, pero la disminución de la fuerza iónica y la adición de agente desnaturizante (150 mOsM, 10 mM DTT) favorecía el desensamblaje de las partículas. Ishizu *et al.* (2001) reportaron que las proteínas estructurales de virus de simio SV40 manipuladas genéticamente para no quelar calcio, no eran capaces de ensamblarse.

Existen pocas teorías sobre el ensamblaje de cápsides virales, pero entre las existentes comparan este proceso con la reacción de polimerización y extrapolan esta aplicación a las proteínas (Endres y Zlotnick, 2002). La consideración más importante es que el ensamblaje está controlado por la difusión molecular de los monómeros (proteínas). Además, que es un proceso en estado de equilibrio donde las especies predominantes son los monómeros o las cápsides. La concentración de los intermediarios es demasiado pequeña en comparación con los dos estados de equilibrio (Zlotnick 1994, Endres y Zlotnick, 2002). Estas consideraciones se han corroborado con cápsides virales de hepatitis B, bromovirus, papilomavirus y virus de la enfermedad bursal (Zlotnick *et al.*, 2000; Hu y Bentley, 2000). Zlotnick y Stray (2003) reportaron que en el ensamblaje de la cápside de hepatitis B, el paso limitante en la conformación de la estructura es la formación del dímero, por lo que el proceso en la fase inicial es lento hasta alcanzar una concentración crítica de dímeros, que posteriormente forman la cápside. Estos resultados se obtuvieron por medio de análisis de dispersión de luz y cromatografía de exclusión molecular. Estas consideraciones son importantes para saber qué condiciones se deben mantener en la producción y purificación de las PPV's virales.

2.1.3. Rotavirus. Estructura y morfología.

El rotavirus pertenece a la familia *Reoviridae*. Es un virus cuyo genoma está formada por 11 segmentos de RNA de doble cadena, para un total de 18.5 kpb. El RNA y 2 proteínas estructurales (VP1 y VP3), están confinados en el interior de una cápside de tres capas formada por las proteínas VP2,VP6,VP7 y VP4 (Estes y Cohen, 1989; Kipikian y Chanock, 1996; Mathieu *et al.*, 2001). **Tabla 2.1.** y **Figura 2.2.**

Tabla 2.1. Proteínas estructurales de rotavirus^a

Proteína	PM (kDa)	# de moléculas / virión	% Proteína total
VP2	102.5	120 (60 dímeros)	15
VP6	41	780 (260 trímeros)	51
VP7	34	780 (260 trímeros)	30
VP4	88	120 (60 dímeros)	1.5

^a Adaptada de Kipikian y Chanock (1996).

La nucléocápside está conformada por la proteína VP2. Estructuralmente la proteína VP2 consta de 880 aminoácidos (aa). Tiene dos dominios de Zipper de Leucina entre los aa 536-557 y 665-686. La región amino terminal (aa 1-132), es la zona de unión de VP2, en la cual interactúa con las proteínas VP1, VP3 y el RNA viral. La formación de la nucléocápside se da por la interacción de 120 unidades de VP2. Esta nucléocápside tiene un diámetro de 50 nm y si se expresa VP2 de forma recombinante en células de insecto, tiene la capacidad de auto-ensamblarse. La formación de esta estructura es necesaria para la continuación del ensamblaje de la PPV's completa (Labbé *et al.*, 1991; Prasad *et al.*, 1988; Estes y Cohen, 1989; Zeng *et al.*, 1998).

La siguiente capa está conformada por 260 subunidades de VP6. Estas subunidades son trímeros de VP6 para un total de 780 moléculas. Mathieu *et al.*

(2001) obtuvieron la estructura cristalina de VP6 mediante difracción de rayos X y determinaron que VP6 tiene dos dominios (H y B). El dominio H está formado casi exclusivamente por estructuras β plegadas y es el responsable de la formación de los trímeros mientras que el dominio B está conformado por α hélices y es la parte de VP6 que interactúa con la cápside de VP2. Para el correcto ensamblaje de VP6 es necesario que la capa interna de VP2 ya esté conformada, debido a que VP6 presenta polimorfismo estructural dependiendo del pH y fuerza iónica. Este polimorfismo consiste en que VP6 se puede autoensamblar en diferentes estructuras (trímeros, esferas, túbulos y pequeños agregados). La estructura formada por las proteínas VP2 y VP6 tiene un diámetro de 70 nm (Mathieu *et al.*, 2001; Charpillienne *et al.*, 2001; Gilbert *et al.*, 2001).

La tercera capa del rotavirus está conformada por la proteína glicosilada VP7. El ensamblaje de VP7 es altamente dependiente de Ca^{++} (mayor de 600 nM). La proteína más externa es VP4 que conforma las 60 espículas características del rotavirus (Ruiz *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 2001a) (**Figura 2.2**).

La expresión recombinante de estas proteínas puede originar una variedad de estructuras: la cápside formada por la proteína VP2 (2 PPV), la formada por VP2 y VP6 (2/6 PPV), por VP2, VP6 y VP7 (2/6/7 PPV), por VP6 y VP7 (6/7 PPV) y la estructura completa formada por las 4 proteínas (2/6/7/4 PPV) (Sabara *et al.*, 1991; Palomares *et al.*, 2002).

El rotavirus es patógeno para diversos animales (hombre, aves, cerdos, etc). Infecta las células epiteliales del intestino delgado. La infección por rotavirus causa gastroenteritis aguda, daño en la mucosa intestinal y deshidratación. El 10% de la diarrea infantil y el 30% de las muertes asociadas en niños menores de 5 años es por infección de rotavirus y aproximadamente 800,000 menores mueren anualmente a nivel mundial (O'Neal *et al.*, 1997; Conner *et al.*, 1997).

El ciclo de replicación de rotavirus en las células animales empieza con la interacción de VP7 y VP4 con varios receptores en la membrana celular. Posteriormente, al entrar el virus a la célula, se pierde la capa formada por VP7 y VP4, debido a la baja concentración de calcio al interior de la célula (con respecto al ambiente extracelular). El proceso de transcripción y replicación sucede en el

citoplasma. Una vez que la capsida 2/6 está al interior de la célula, se liberan los transcritos que codifican para las proteínas estructurales y no estructurales.

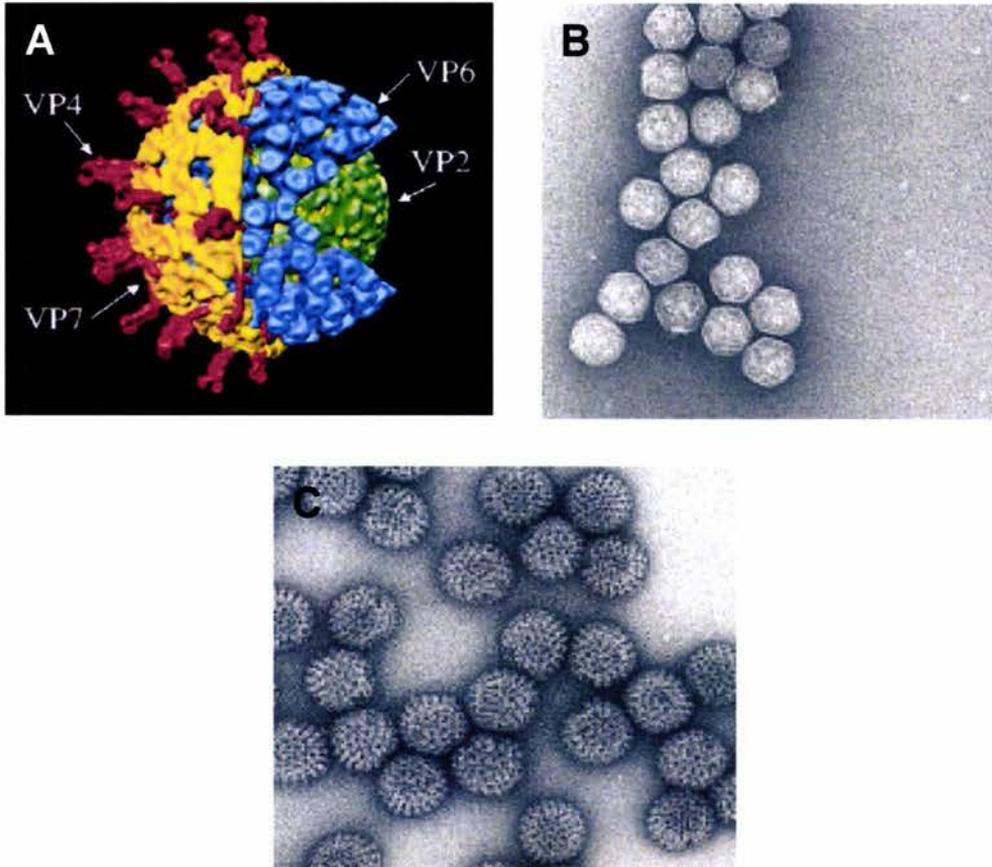


Figura 2.2. A) Diagrama de la estructura de rotavirus (Tomada de Patton *et al.*, 2000). B) y C) Micrografías electrónicas de la 2 PPV's (núcleocápside) y la 2/6 PPV's (tomadas de Charpilliene *et al.*, 2001).

La síntesis de VP1, VP2, VP3, VP6 y otras proteínas no estructurales se hace por ribosomas libres en el citoplasma y estas proteínas se encuentran concentradas en viroplasmos donde se ensamblan las proteínas VP2, VP6 y se empaqueta el material genético. La síntesis de la proteína VP7, se hace en ribosomas asociados al retículo endoplasmático (RE). El ensamblaje de VP7 y VP4 a la cápside no está del todo esclarecido. Algunos autores indican que primero se asocia la partícula

2/6 con la proteína VP4 y que posteriormente en el RE madura el virus con la inclusión de VP7 (Estes, 1996; Patton *et al.*, 2000).

En lo referente a la utilidad de las PPV's como posibles candidatos a vacunas, la administración oral de las PPV's 2/6, 2/6/7 y 2/6/7/4 en conejos generó una respuesta inmune que se considero aceptable para su estudio como vacuna. Esta respuesta fue más elevada en las PPV's conformadas por 2/6/7 y 2/6/7/4, sobresaliendo que con la PPV 2/6/7/4 se obtuvo una protección del 100% en algunos casos (Ciarlet *et al.*, 1998). O'Neal *et al.* (1997) reportaron un estudio inmunológico comparativo entre las PPV's 2/6 y 2/6/7 aplicadas vía oral e intranasal en ratones. Los resultados de este estudio fueron que la mayor protección se obtuvo con la PPV 2/6/7 (100%) mientras que la protección con la PPV 2/6 fue del 92% (intranasal). Por lo anterior es factible desde el punto de vista inmunológico y tecnológico que la PPV 2/6 sea utilizada como vacuna para la infección de rotavirus.

2.1.4. Expresión de PPV's en sistemas recombinantes

Las proteínas estructurales de diferentes PPV's se han expresado en bacterias, levaduras, células de mamífero y células de insecto. Sin embargo, el sistema de células de insecto es el más utilizado para la obtención de PPV's (**Tabla 2.2.**).

La preferencia por utilizar el sistema CI-BV se debe a la versatilidad en la expresión de las cápside virales conformadas por más de una proteína estructural, además de que el ambiente eucariótico proporciona las condiciones óptimas para el ensamblaje (**Sección 2.2.1 y Sección 2.2.2**).

En sistemas de bacterias no hay evidencia de ensamblaje en los cultivos de las partículas en comparación con el sistema de CI-BV. Diferentes autores han obtenido altos niveles de expresión de la proteína recombinante L1 de papilomavirus en *E. coli*. Sin embargo, para obtener las PPV's es necesario desnaturalizar los cuerpos de inclusión y realizar el ensamblaje de la proteína *in vitro*, siendo este proceso menos eficiente que el ensamblaje *in vivo* (Zhang *et al.*, 1998; Li *et al.*, 1997; Chen *et al.*, 2001). En contraste, Rose *et al.* (1993)

expresaron la misma proteína en células Sf9 y detectaron PPV's correctamente ensambladas en el núcleo de la célula.

Tabla 2.2. Pseudo-partículas virales expresadas en diferentes sistemas.

Pseudo-Partícula Viral	Sistema de expresión ^a
Hepatitis B	CI-BV, levadura
Hepatitis C	CI-BV, células COS
Hepatitis E	CI-BV
Herpes simplex	CI-BV
Papilomavirus	CI-BV, E. coli
Parvovirus B19	CI-BV
Poliomavirus	CI-BV, levadura
Rotavirus	CI-BV
VIH	CI-BV
Virus Norwalk	CI-BV
Virus de enfermedad infecciosa bursal	CI-BV
Virus de fiebre aftosa	CI-BV

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

También se han expresado PPV's en levaduras, específicamente de poliomavirus y hepatitis B. Palkova *et al.* (2000) reportaron que las PPV's (poliomavirus) expresadas en *Saccharomyces cerevisiae* se ensamblaron en estructuras similares a las obtenidas en células de insecto, además que en la levadura estas PPV's se encontraban preferentemente en el núcleo. La ventaja de utilizar células de insecto con respecto a levadura (y bacteria), es la versatilidad ingenieril de producir PPV's con estructuras más complejas formadas por más de una clase de proteína. En el sistema de CI-BV se puede expresar 4 ó 5 proteínas estructurales de una cápside y además es posible manipular el nivel de expresión (**Sección 2.2.1**). En cambio aunque en levadura se puede realizar la construcción molecular para expresar 2 o 4 proteínas estructurales, no es muy versátil la manipulación de la expresión (Takehara *et al.*, 1988; Tlegabulova *et al.*, 1998).

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

Inicialmente el baculovirus fue utilizado como agente de control biológico, debido a que es patógeno natural de larvas de gran variedad de insectos. Pero es hasta 1983 que Smith *et al.* (1983) infectaron cultivos de células de insecto con baculovirus genéticamente modificados. Este estudio abrió las posibilidades para poder expresar una serie de productos de interés biotecnológico.

El sistema células de insecto-baculovirus, debido a su versatilidad, alta productividad (comparada con células animales) y capacidad de llevar a cabo modificaciones postraduccionales complejas (comparada con bacterias y levaduras) en la actualidad es ampliamente utilizado para la expresión de proteínas recombinantes, tanto a nivel laboratorio como a nivel industrial (Palomares *et al.*, en prensa).

El sistema CI-BV consiste en un vector (baculovirus) que infecta células de insecto (huésped), donde se expresan las proteínas recombinantes. La expresión de los genes recombinantes se hace bajo los promotores *polh* o *p10*. Se utiliza especialmente el promotor *polh* debido a que en la infección de células de insecto por baculovirus nativo, la proteína expresada bajo este promotor (poliedrina) es aproximadamente del 30-50% del contenido total de proteína celular. Por lo tanto los baculovirus recombinantes en vez de tener el gen de la poliedrina, llevan el gen de la proteína que se desea expresar (Palomares *et al.*, en prensa).

2.2.1. Baculovirus

La familia de virus *Baculoviridae* es la más conocida entre los virus de insecto. Son virus de cadena doble circular de ADN embebidos en una cápside proteica. El nombre de *Baculoviridae* es debido a que estos virus tienen forma de báculo (bastón). Recientemente esta familia se subdividió en dos subfamilias, *baculovirinae* y *nudibaculovirinae*, para distinguir la presencia o ausencia de formas ocluidas (uno o más viriones embebidos en cápsides proteicas). La subfamilia *baculovirinae* se subdivide en, nucleopoliedrovirus (NPV) y

granulovirus (GNV). La diferencia consiste en que los NPV tienen varios viriones por cuerpo ocluido, mientras que los GNV sólo es un virión por cuerpo ocluido. (Gruenwald y Heitz, 1993; Miller, 1996; Palomares *et al.*, en prensa) (**Figura 2.3**).

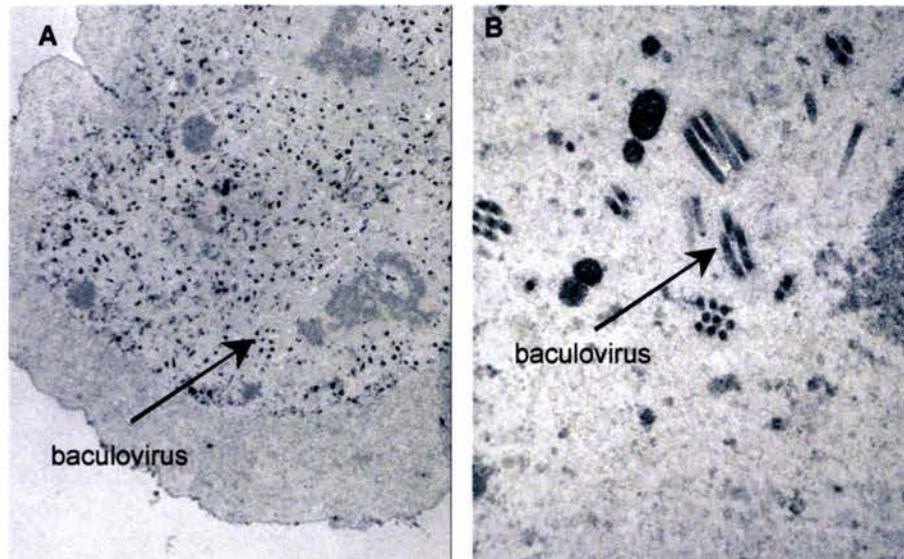


Figura 2.3. Micrografía electrónica de célula de insecto infectada por baculovirus (48 horas post-infección). **A.** 3000X. **B.** 20000X.

El baculovirus consiste en una estructura de 40-50 nm de diámetro y 200-400 nm de largo. Su genoma es aproximadamente de 80-230 kpb. La matriz poliédrica donde están embebidos los viriones está formada por la proteína poliedrina (29 kDa). Mediante manipulación genética se han modificado varios baculovirus para la expresión de proteína recombinante. Entre los baculovirus modificados el de mayor desarrollo ha sido el virus de multinuclearpoliedrosis de *Autographa californica* (AcMNPV).

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

liberados para infectar otras células (infección secundaria). Y finalmente la fase muy tardía (20-24 h.p.i.), que es la de mayor interés del sistema CI-BV, ya que en esta fase se expresan los genes (*polh* y *p10*) también conocidos como genes hiperexpresados. Estos genes no son esenciales para la producción *in vitro* de baculovirus. El ciclo del baculovirus nativo es igual en el sistema CI-BV con la diferencia que no se producen cuerpos ocluidos (Smith *et al.*, 1983; O'Reilly *et al.*, 1994; Miller, 1996; Palomares *et al.*, en prensa) (**Figura 2.4**).

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

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

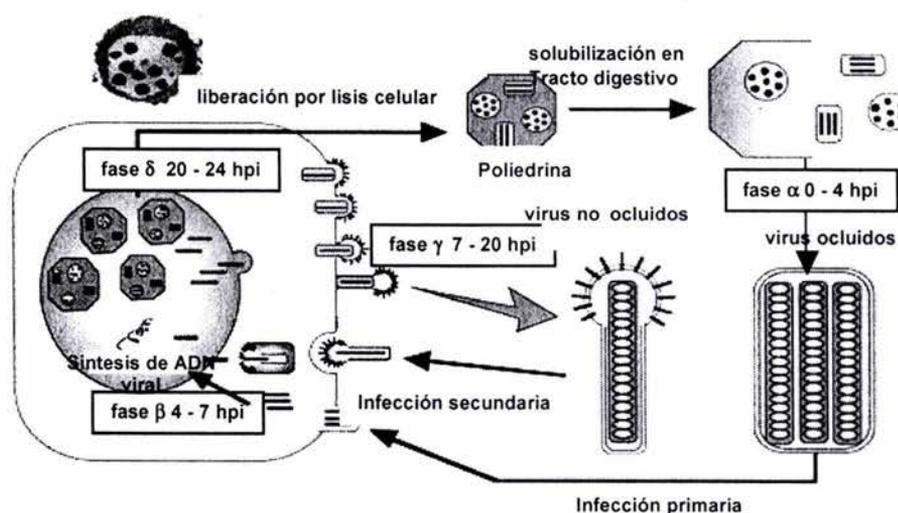


Figura 2.4. Ciclo viral del baculovirus en la célula de insecto. Diseño Adrián Delgado

2.2.2. Células de insecto

En la actualidad existen diversas líneas celulares que se pueden cultivar *in vitro*, pero las más usadas son las líneas celulares Sf9, Sf21 (*Spodoptera frugiperda*), Tn 5B1-4 disponible comercialmente con el nombre High Five™, Tn-4h (*Trichoplusia ni*) (Palomares *et al.*, en prensa). La expresión de proteínas recombinantes en células de insecto tiene varias ventajas como:

- Un ambiente eucariótico para la producción de proteínas recombinantes, lo que ayuda a su plegamiento y evita la formación de cuerpos de inclusión, induce la correcta formación de enlaces disulfuro, procesamiento postraduccional como N-glicosilación, fosforilación, acilación, amidación y carboximetilación, en algunos casos idénticas o similares a al procesamiento hecho en células de mamíferos (O'Reilly *et al.*, 1994).
- Altos niveles de expresión de proteína recombinante en comparación con los sistemas de células de mamíferos (Palomares *et al.*, en prensa).
- Expresión de proteínas sensibles a la temperatura. Esto se debe a que la temperatura óptima de cultivo de las células de insecto es 27 °C, lo que evita la desnaturalización térmica de algunas proteínas sensibles a 37 °C (O'Reilly *et al.*, 1994).
- Simplicidad tecnológica desde el punto de vista que, en la mayoría de los casos, sólo se necesita desarrollar el baculovirus recombinante sin necesidad de obtener nuevas líneas celulares para expresar la proteína (O'Reilly *et al.*, 1994; Palomares *et al.*, en prensa).

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

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

La multiplicidad de infección (MDI) es el número de partículas infecciosas que se adiciona por célula en el cultivo. Una MDI de 1 ufp/célula significa que por cada célula de insecto en el cultivo se ha adicionado una partícula infecciosa del baculovirus. En cambio una MDI de 10 ufp/célula significa que se han adicionado 10 partículas infectivas por cada célula de insecto en el cultivo. La adición de 10 ufp/célula no indica que cada célula esté infectada por 10 baculovirus. La distribución del número de células infectadas es probabilístico y puede ser descrito mediante la distribución de Poisson (**Figura 2.5** y **Ecuación 2.1**).

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

Donde P es la probabilidad que una célula este infectada por r partículas infecciosas. Mediante la MDI es posible manipular la velocidad específica de producción de proteína y también la concentración máxima de proteína. Esto se debe a que al incrementar la MDI, se aumenta la probabilidad de que una célula sea infectada por más de un baculovirus, y por ende aumenta el número de copias del gen de interés que será expresado en la célula. Esta manipulación depende de la etapa del cultivo y la línea celular. En cultivos en inicio de la fase exponencial, incrementar la MDI no significa un aumento en la concentración de proteína. En contraste, si la infección se hace a la mitad de la fase exponencial de crecimiento, un aumento en la MDI se refleja en un incremento de la concentración de proteína (Licari y Bailey, 1991; Tsao *et al.*, 1996; Wong *et al.*, 1996; Palomares, 1999).

En lo referente a la velocidad de producción, Palomares *et al.* (2002) reportó que un incremento de 1 a 10 ufp/célula en la MDI repercute en un aumento en la

velocidad específica de producción de VP2 de 0.2 a 0.8 UA/mL*h. Estos experimentos fueron hechos con células Sf9.

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

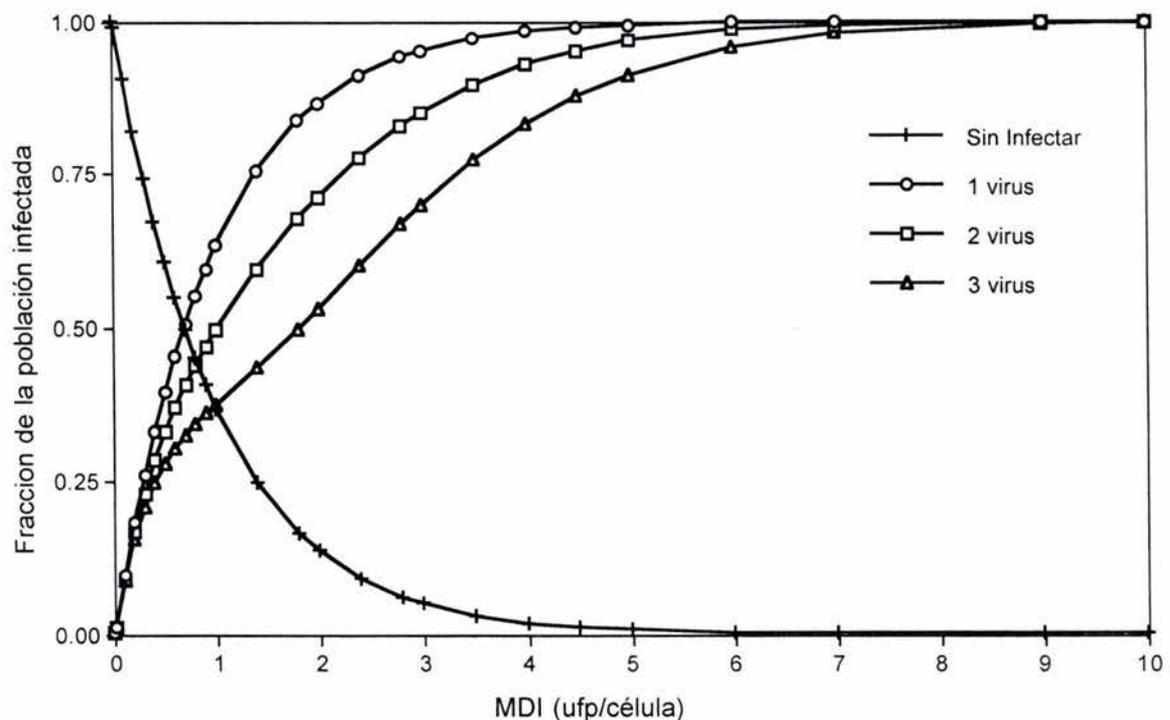


Figura 2.5. Probabilidad de que las células sean infectadas por un baculovirus o más dependiendo de la MDI, según la distribución de Poisson.

Diferentes autores han determinado experimental y matemáticamente el tiempo de infección óptimo. Power *et al.* (1994) determinaron el tiempo de infección óptimo para la producción de β -galactosidasa en células Sf9. Este tiempo de infección fue función de la MDI utilizada (para cada MDI existe un TDI óptimo). En el caso de 10

ufp/célula el TDI óptimo fue $2.1 \cdot 10^6$ células/mL y observaron que al aumentar o disminuir el tiempo de infección ($1 \cdot 10^6$ células/mL y $2.8 \cdot 10^6$ células/mL) disminuyó la concentración de β -galactosidasa en 50 y 30% respectivamente. En este caso el TDI óptimo fue cuando las células se encontraban en fase exponencial. En la consideración del TDI óptimo también es necesario tener en cuenta el efecto de la línea celular. Las células High Five™ tienen una productividad mayor que la células Sf9. Este aumento en la productividad conlleva un aumento en el consumo de nutrientes especialmente oxígeno. El consumo específico de oxígeno (qO_2) de las células High Five™ es aproximadamente 2 veces mayor que en células Sf9 (Rhiel *et al.*, 1997). Además esta velocidad de consumo aumenta en instantes posteriores a la infección. Por lo anterior estrategias de elevados TDI para la línea celular Sf9 no son extrapolables en el caso de la línea High Five™ (Palomares y Ramírez, 1996; Agathos, 1996).

2.2.4. Expresión de PPV's en el sistema CI-BV

Además de las ventajas enunciadas anteriormente (**Sección 2.2.1 y Sección 2.2.2**), otra ventaja es la posibilidad de manipular la expresión de las proteínas estructurales. Esta manipulación puede ser utilizada para optimizar el ensamblaje de las PPV's estequiométricamente definidas (más de una clase de proteína estructural) o manipular las proporciones de proteínas en cápsides virales que presentan polimorfismo. (Tsao *et al.*, 1996; Hu y Bentley, 2001; Palomares *et al.*, 2002).

Existen dos estrategias en la producción de PPV's multiproteicas. Una es la infección con un baculovirus múltiple que codifica simultáneamente para varias proteínas recombinantes o la coinfección con varios baculovirus donde c/u codifica para una proteína recombinante.

La primera estrategia fue utilizada por Roy *et al.* (1997) para la producción de PPV's del virus de la lengua azul (BTV). Este virus pertenece a la familia *Reoviridae* y tiene similitud estructural con la cápside de rotavirus. Su cápside esta conformada por 4 proteínas estructurales. Utilizando un baculovirus doble (VP3 y

VP7) obtuvieron cápsides virales con una relación entre proteínas 2:15, relación similar a la cápside nativa. Sin embargo, se desconoce la concentración de proteína que quedó sin ensamblarse.

La segunda estrategia consiste en usar n número de baculovirus por n número de proteínas a expresar. Esta estrategia permite manipular la expresión de las proteínas estructurales según la MDI utilizada para cada baculovirus. Tsao *et al.* (1996) implementaron la estrategia de coinfección con dos baculovirus (VP1 y VP2) para la producción de PPV's de parvovirus B19. Sus resultados demostraron que mediante la manipulación de la MDI (cada baculovirus) y la relación de MDI (MDI VP1/MDI VP2) fue posible optimizar y manipular la producción y composición de la PPV's.

Hu y Bentley (2001), mediante modelamiento matemático y comprobación experimental, determinaron el efecto de la manipulación de la MDI y la relación entre MDI en el rendimiento de PPV's. Sus conclusiones fueron que la manipulación de la relación de MDI permite optimizar el ensamblaje y también dirigirlo a PPV's que no tienen una estequiometría definida.

En el caso de rotavirus, sus PPV's tienen una arquitectura y estequiometría definida. Desde este punto de vista, la estrategia de coinfecciones es acertada ya que un exceso o sobreexpresión de las diferentes proteínas estructurales sin mantener la relación estequiométrica, no conllevaría a una optimización en la producción de PPV's, pero sí a un gasto energético innecesario. Esto fue observado por Palomares *et al.* (2002) en la producción de 2/6 PPV's en células Sf9. Cuando se realizó la infección a MDI de 1 ufp/célula de cada baculovirus, la concentración de VP6 fue 13 veces mayor que VP2, mientras que la relación estequiométrica entre VP2 y VP6 en la PPV (en concentración) es de 2.84. Pero con relaciones de MDI (MDI bac VP2/MDI bac VP6) entre 1.5 y 5 se obtuvo una relación cercana a la estequiométrica, aunque no determinaron si estas MDI optimizaron el ensamblaje.

Otro aspecto relevante pero no evidente es la influencia de la localización de la proteína en la eficiencia del ensamblaje. Aunque en las células de mamífero se ha determinado la localización de las proteínas de rotavirus, en el sistema de CI-BV

este aspecto no ha sido estudiado, y las inferencias que se tienen es por su presencia o ausencia en el pellet celular y/o en el sobrenadante del cultivo (Labbé *et al.*, 1991; Sabara *et al.*, 1991., Palomares, 1999). La relevancia de la localización celular de la proteínas estructurales es que aunque se alcancen las concentraciones óptimas (desde el punto de vista estequiométrico), esto no implica que las proteínas estén en contacto para ensamblarse. Jiang *et al.* (1998) estudió la producción de las PPV 2/6 y 2/6/7 de rotavirus en células Sf9 mediante la coinfección con tres baculovirus. Las 2/6/7 PPV's se encontraron en el sobrenadante del cultivo mientras que las 2/6 PPV's en el citoplasma celular. Realizando un análisis estequiométrico se observó que la concentración de VP7 era más que suficiente para ensamblarse a las 2/6 PPV's y obtener mayor rendimiento en la producción de la cápside 2/6/7. Este resultado se atribuyó a que probablemente la proteína VP7 (glicosilada) era liberada al medio antes de poder ensamblarse con la 2/6 PPV que se encontraba en la célula.

Analizando la utilidad de las PPV's como vacunas (2/6 PPV's de rotavirus), las ventajas del sistema de CI-BV para expresar cápsides virales, la complejidad del proceso en conjunción con la influencia de diferentes factores en el óptimo ensamblaje y rendimiento en la producción de PPV's, hacen necesario el estudio del ensamblaje y producción de PPV's en el sistema de CI-BV, con el objetivo de desarrollar estrategias racionales de producción de PPV's. Este estudio se realizará inicialmente con la 2/6 PPV, y estos resultados servirán para extrapolarlos a la producción de otras cápsides virales.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Estudiar la producción de la pseudo-partícula viral 2/6 de rotavirus desde una perspectiva celular y cinética para desarrollar estrategias racionales de producción de PPV's de rotavirus.

3.2. Objetivos específicos

Desarrollar un método objetivo y cuantitativo para la determinación del título viral de baculovirus recombinantes.

Estudiar la localización celular de las proteínas estructurales de rotavirus en las células de insecto.

Determinar el efecto de la MDI en la concentración máxima y en la velocidad específica de producción de las proteínas estructurales de rotavirus.

Desarrollar un método de cuantificación *in vivo* de la proteína estructural GFPVP2.

Implementar la cromatografía líquida (HPLC) para la cuantificación y purificación de las PPV's de rotavirus.

4. MATERIALES Y METODOS

4.1. Línea Celular

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

4.2. Medio de Cultivo

Se utilizó el medio de cultivo libre de suero SF-900II (GIBCO-Invitrogen, USA), el cual viene en estado líquido y estéril. Este medio está formulado para cultivar células de insecto (Sf9, Sf21, High Five™), y su composición es confidencial. Sin embargo, algunos de sus componentes han sido determinados en diferentes estudios (Schlaeger *et al.*, 1996; Radford *et al.*, 1997; Hu y Bentley, 1999; Doverskog *et al.*, 2000) **Tabla 4.1**.

Tabla 4.1. Principales componentes del medio SF-900II

Componente	Unidad	Concentración
Glucosa	g/L	10
Maltosa	g/L	1.2
Sacarosa	g/L	2.05
Glutamina	mM	10-14
Aminoácidos ^a	mM	113
Pluronic F-68		presencia
Extracto de Levadura		presencia

^a Asp, Glu, Asn, Ser, His, Arg, Thr, Pro, Tyr, Val, Met, Ile, Leu, Phe, Trp, Lys, Cys y Ala.

El Pluronic F-68 es un tensoactivo que se adiciona al medio de cultivo para proteger las células de los esfuerzos de corte por agitación. Los azúcares maltosa y sacarosa son agregados para regular la osmolaridad del medio de cultivo.

4.3. Baculovirus Recombinantes

En la **Tabla 4.2** se encuentran los diferentes baculovirus utilizados tanto en las cinéticas de expresión como en los ensayos de inmunofluorescencia.

Tabla 4.2. Baculovirus recombinantes utilizados

Baculovirus	Proteína	Cepa	Promotor	Referencia
bac GFPVP2	GFPVP2 (120 KDa)	RF	Poliedrina	Charpillienne <i>et al.</i> , 2001
bac VP2	VP2 (102 KDa)	RF	Poliedrina	Crawford <i>et al.</i> , 1994
bac VP6	VP6 (44 KDa)	SA-11	Poliedrina	Crawford <i>et al.</i> , 1994

* El baculovirus bac GFPVP2 codifica para la proteína de fusión GFP-VP2, que es una quimera compuesta por la proteína VP2 y la proteína EGFP (Enhanced Green Fluorescent Protein), se referenciará la proteína EGFP como GFP.

Los baculovirus bac VP2 y bac VP6 fueron donados por la Dra. Susana López (IBT-UNAM). El bac GFPVP2 fue donado por el Dr. Cohen (INRA-Francia). La amplificación de los lotes de virus se llevó a cabo en cultivos suspendidos (frascos agitados) de 150 ml a multiplicidad de infección de 0.1 ufp/célula en células Sf9 (*Spodoptera frugiperda*).

El título viral fue calculado según el método desarrollado en este trabajo y descrito en la **Sección 5.1.** (Mena *et al.*, 2003).

4.4. Cultivos de Células en Suspensión

Los cultivos se realizaron en matraces de 250 ml con 60 ml de medio de cultivo, agitados a 110 rpm y mantenidos a 27 °C. Células High Five™ con viabilidad superior a 95% y en fase exponencial se sembraron a una densidad de 0.5×10^6 células/mL y fueron infectadas en este mismo instante. Todos los ensayos fueron

por duplicado, incluyendo los matraces control (sin infectar). Se tomaron muestras cada 24 h post-infección para medir concentración celular, viabilidad y expresión de proteína.

4.5. Métodos Analíticos

4.5.1. Determinación de concentración, tamaño y viabilidad celular

La concentración y el tamaño celular se determinaron mediante un contador electrónico de partículas con tubo de apertura de 100 μm (Coulter Multisizer II, Coulter Electronics Inc. USA). Para diluir la muestra se utilizó una solución isotónica recomendada por el fabricante del equipo. La viabilidad celular se determinó con la técnica de exclusión de azul de tripano en un hematocitómetro.

4.5.2. Cuantificación de VP6 y GFPVP2

Las proteínas VP6 y GFPVP2 en pellet celular y sobrenadante se cuantificaron a través de inmunodetección en geles desnaturizantes de poliacrilamida, con un gel concentrador al 4% y un gel separador al 8 o 12%. Las muestras se trataron como sigue: se centrifugaron 500 μL de muestra a 10,000 rpm por 10 min. Las células se resuspendieron en 20 μL de agua. Se tomaron 5 μL , se agregaron 10 μL de agua y 5 μL de solución amortiguadora de lisis (200 mM Tris-HCl pH 6.8, 8% SDS, 0.4% azul de bromofenol, 40% glicerol, 1% β -mercaptoetanol). 15 μL de sobrenadante se trataron con 5 μL de solución amortiguadora de lisis. Las muestras fueron hervidas 7 minutos y colocadas en el gel. Se corrieron a 15 mA a corriente constante. Posteriormente, se transfirieron las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, USA) durante 1.5 h a 400 mVolts corriente constante, a través de un sistema semiseco (Owl Scientific, USA) utilizando un sistema discontinuo de soluciones amortiguadoras. Después de la transferencia, las membranas se bloquearon 2 h con una solución al 5% de leche descremada (Carnation Nestle, USA) en una solución amortiguadora de fosfatos (PBS). Las proteínas recombinantes se identificaron a partir de una inmunodetección en

membrana de nitrocelulosa ("Western blot"). La membrana se incubó 2 h con un suero de conejo antirotavirus YM (proporcionado por la Dra. Susana López, IBT-UNAM) a una dilución de 1:3000 en PBS-0.1% leche. Después de 3 lavados con PBS-leche 0.1% (1 de 15 min y 2 de 5 min), la membrana se incubó 1h con un anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Jackson Immunochemicals, USA). Después de lavar, la membrana se reveló utilizando los reactivos quimioluminiscentes ECL (Amersham, USA) y detectando la señal con película Kodak X-OMAT.

La cantidad relativa de las proteínas recombinantes se determinó a través de densitometría de las películas del Western blot. Las películas se escanearon y las bandas se midieron utilizando el paquete NIH Image 1.61/Fat. La intensidad y el área resultantes de la medición se multiplicaron para obtener lo que llamaremos unidades arbitrarias densitométricas (UA). Para estandarizar entre geles, una muestra de cada gel se corrió en un solo gel que se utilizó como estándar (gel maestro).

La cuantificación de proteína total se realizó mediante el microensayo de Bradford (Bio-Rad, USA).

4.5.3. Cuantificación *in vivo* de GFPVP2

Para cuantificar *in vivo* la proteína GFPVP2 fue necesario desarrollar una estrategia experimental (los fundamentos de esta estrategia se discuten en la **Sección 5.2**). Se utilizó un espectrofluorímetro LS-55 y el software FL-Winlab (Perkin-Elmer, U.K.).

La metodología desarrollada es: Cuantificar por Coulter la concentración celular de la muestra a analizar y de un control (células sin infectar). Tomar el volumen necesario para obtener 500,000 células, tanto de la muestra como del control. Centrifugar la muestra y el control a 14,000 rpm durante 10 min. Remover el sobrenadante. Adicionar 1.5 ml de buffer Tris-EDTA y agitar hasta homogenizar. Centrifugar la muestra y el control a 14,000 rpm durante 10 min. Remover el sobrenadante. Adicionar 0.5 ml de buffer Tris-EDTA y agitar hasta homogenizar. Tomar 75 μ L de la muestra y mezclarlos en la celda con 75 μ L de buffer Tris-

EDTA. Leer la fluorescencia en URF (unidades relativas de fluorescencia) a 510 nm excitando a 484 nm. La apertura del monocromador de la lámpara debe ser 2.5 nm y la apertura del fotomultiplicador 20 nm.

4.5.4. Purificación e identificación de pseudo-partículas virales

La purificación de pseudo-partículas virales en cinéticas con células infectadas con bac GFPVP2 y/o bac VP6 se llevo según la siguiente metodología:

El pellet celular se disolvió en buffer lisis (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 2 % deoxicolato de sodio) y se sonicó durante 3 min con intervalos de 10 segundos. Posteriormente se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min. Se separó el sobrenadante. En tubos de ultracentrífuga (Beckman, U.K.) se adicionó 1.89 g de CsCl (0.42 g/mL) con el sobrenadante hasta el volumen de 4.5 ml. Se centrifugó durante 18h a 35,000 rpm en un rotor SW 50.1 (Beckman, U.K.). Se recolectaron las bandas que constituyen las PPV. La pureza e identidad de las PPV se confirmaron por inmunodetección en membranas de nitrocelulosa (ver **Sección 4.5.3**).

Los sobrenadantes de medio de cultivo se ultracentrifugaron (2h, 25,000 rpm, rotor SW 28) a través de un colchón de sacarosa ultrapura (GIBCO, USA) al 35% p/v en solución TNC (1.58 g/L Tris.HCl, 8.18 g/L NaCl, pH 7.5). Se purificaron las PPV's del pellet obtenido utilizando gradientes de cloruro de cesio en buffer TNC.

4.5.5. Caracterización y cuantificación de PPV's por HPLC

Para la implementación de la cromatografía líquida se utilizó un HPLC marca WatersTM (Massachussets, USA) con los siguientes componentes:

- Sistema de bombas Waters 626
- Controlador Waters 600S
- Detector de fluorescencia Waters 2475 (λ_{EXC} 484 nm y λ_{EM} 510 nm)
- Detector de arreglo de diodos Waters 929 ($\lambda = 280$ nm)
- Software Millenium 32TM

El flujo utilizado fue 0.9 mL/min a 37 °C de buffer Tris-EDTA (10 mM-0.1 mM).

Se utilizaron las columnas de permeación en gel Waters Ultrahydrogel 500 y Waters Ultrahydrogel 2000.

4.6. Inmunofluorescencia

En placas de 12 pozos sobre discos de vidrio (24 mm) se sembraron 96,000 células infectadas a MDI de 5 ufp/célula en un volumen de 1 ml. A las 48 h post-infección se retiró el sobrenadante y se lavó dos veces el disco (con las células) con PBS. Se adicionó 1 ml de solución fijadora (PBS-2% formaldehído) y se dejó en reposo por 15 minutos. Para permeabilizar y bloquear se adicionó 1 ml de solución PBS (50 mM NH₄Cl, 0.3% Tritron X-100, 2% BSA) y se dejó en reposo por 15 min. Seguido se lavó tres veces con PBS (50mM NH₄Cl). Posteriormente se adicionaron 100 µL del anticuerpo primario y se dejó reposar por 1 h. Los anticuerpos se diluyeron 1/100 en PBS (50 mM NH₄Cl, 0.1% BSA) (**Tabla 4.3**). Se lavó tres veces con PBS-50 mM NH₄Cl. Se adicionaron 100 µL del anticuerpo secundario (acoplado a un fluoróforo). Se lavó tres veces con PBS (50 mM NH₄Cl). Se separó el disco y se colocó sobre un portaobjetos con una gota de Cytofluor (Molecular Probes, USA). Se dejó en la oscuridad y a -70 °C hasta analizar las muestras en microscopio confocal (MRC-300, Bio-Rad) o de epifluorescencia (Eclipse TE300, Nikon).

Tabla 4.3. Anticuerpos utilizados

Anticuerpo	Clase	Origen	Antígeno
255/6	Monoclonal	Ratón	VP6
8A2	Monoclonal	Ratón	VP2
GFP	Monoclonal	Ratón	GFP
YM	Policlonal	Conejo	proteínas Rotavirus
Alexa Fluor 488 ^a	Policlonal	Cabra	IgG ratón
Alexa Fluor 568 ^a	Policlonal	Cabra	IgG ratón
Alexa Fluor 488 ^a	Policlonal	Cabra	IgG conejo
Alexa Fluor 568 ^a	Policlonal	Cabra	IgG conejo
Tubulina	Monoclonal	Ratón	Tubulina

^a Alexa –Fluor es marca registrada de Molecular-Probes (USA). Alexa-fluor 488 en verde. Alexa-Fluor 568 en rojo.

4.7. Microscopía electrónica

Las PPV's purificadas por gradiente de CsCl y HPLC fueron sometidas a análisis por microscopía electrónica con tinción negativa. 10 μ L de PPV's se fijaron en rejilla de 200 mesh (con Formvar y carbon) durante 1 min. Posteriormente se lavó con agua la rejilla y se colocó en contacto con 10 μ L de solución de acetato de uranilo (2% acuoso) durante 1 min. Se lavó la rejilla con agua y se dejó secar bajo luz de lámpara. La observación se realizó en microscopio electrónico Zeiss EM 900 (Zeiss, Alemania) en aumentos desde 3,500 hasta 140,000. La preparación de las muestras y la micrografías fueron realizadas por Rebeca Najera y Dra. Rosana Sánchez, en la unidad de microscopía electrónica del IBt-UNAM.

4.8. Consideraciones matemáticas

4.8.1. Cálculo de la velocidad específica de producción de proteína

El cálculo de la velocidad específica se realizó según el modelo cinético de Luedenking-Piret (**Ecuación 4.8.1**). Este modelo contempla que la cinética de producción puede ser asociada al crecimiento (dependiente de μ) y/o asociada a la concentración celular (dependiente de X):

$$dP/dt = (\alpha \cdot \mu + \beta) X \quad \text{(Ecuación 4.8.1)}$$

donde α y β son parámetros cinéticos, μ la velocidad de crecimiento y X la concentración celular. En el cultivo de células de insecto la infección viral (MDI, TDI) afectan la velocidad de crecimiento; las células infectadas cesan de crecer y el crecimiento celular esta dado por las células no infectadas. La producción de proteína depende de las células infectadas y viables, por lo tanto la producción de proteína no está asociada al crecimiento y el término significativo en la cinética de producción en la **Ecuación 4.8.1** es β .

La ecuación de Luedenking-Piret es una ecuación diferencial de primer orden que después de resolverla por el método de variables separables, se reduce a la expresión:

$$P = P_0 + \beta \int X_v dt ; 0 \rightarrow t \quad (\text{Ecuación 4.8.2})$$

Donde P y P_0 es la concentración de proteína al tiempo 0 y t (respectivamente), y X_v la concentración celular viable.

En $t = 0$ no existe producción de proteína por lo que $P_0 = 0$. Entonces despejando β de la **Ecuación 4.8.2**.

$$\beta = P / \int X_v dt ; 0 \rightarrow t \quad (\text{Ecuación 4.8.3})$$

siendo β la velocidad específica de producción de proteína (g/célula*h).

El termino $\int X_v dt$, es el índice de viabilidad (células*h/L), y se puede estimar por el área bajo la curva de la gráfica de células viables con respecto al tiempo (Luan *et al.*, 1987; Ramírez y Mutharasan, 1990).

5. RESULTADOS Y DISCUSION

En este capítulo el estudio del ensamblaje de PPV's de rotavirus se dividió en cuatro secciones. En la primera se desarrolló un método de titulación viral objetivo y cuantitativo. En la segunda sección se estudió el proceso de ensamblaje a nivel celular, analizando la localización de las proteínas estructurales cuando se expresaron independientemente o en coinfección. En la tercera parte se analizó la producción de las proteínas estructurales desde el punto de vista cinético y el efecto de la MDI en la velocidad de producción y en la proteína máxima alcanzada. Por último con el fin de desarrollar estrategias cuantitativas y objetivas de análisis de PPV's se estudió la implementación de la cromatografía líquida como herramienta para el análisis de PPV's.

5.1. Nuevo método de titulación de baculovirus recombinantes.

Para utilizar la MDI como herramienta para manipular las velocidades de producción y concentraciones de proteínas estructurales, es necesario poder determinar objetiva y exactamente el título viral de los lotes de baculovirus a utilizar. Los métodos tradicionalmente utilizados para la determinación del título viral son largos, costosos y subjetivos, por lo tanto fue necesario desarrollar un método para la cuantificación del título viral. El método que a continuación se describe está basado en la relación entre la viabilidad celular y el título viral, ya que el baculovirus es un virus lítico. Se trata de un ensayo de viabilidad con MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio, Sigma-Aldrich, USA) que se cuantifica por absorbancia, lo que elimina la subjetividad en la determinación del título viral, tradicionalmente evaluado por los efectos citopatológicos causados por el baculovirus. Por medio de este método se determinaron títulos virales en el rango 1×10^5 ufp/mL hasta 1×10^{10} ufp/mL con una reproducibilidad ± 0.15 Log comparado con el valor típico ± 0.5 Log de los métodos tradicionales. Además se logró disminuir el tiempo de ensayo de 10 a 6 días. Este método puede ser extrapolable para la titulación de otros virus líticos.

Benchmarks

products in a cell-free transcription/translation system: synthesis of antibacterial peptide cecropin. *FEBS Lett.* 414:268-270.

5. Nemetz, C., S. Wessner, R. Schweizer, M. Watzel, T. Metzler, W. Mutter, and B. Buchberger. 2002. RTS: rapid protein expression directly from PCR fragments. *Biochemica* 2:22-24.
6. Sauer, B. 1994. Site-specific recombination: developments and applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 5:521-527.
7. Spirin, A.S., V.I. Baranov, L.A. Ryabova, S.Y. Ovodov, and Y.B. Alakhov. 1988. A continuous cell-free translation system capable of producing polypeptides in high yield. *Science* 242:1162-1164.

Address correspondence to Dr. Cordula Nemetz, Roche Diagnostics GmbH, Nonnenwald 2, 82377 Penzberg, Germany. e-mail: cordula.nemetz@roche.com

Received 15 October 2002; accepted 5 December 2002.

**Andrea Graentzdoerffer and
Cordula Nemetz**

*Roche Diagnostics GmbH
Penzberg, Germany*

For reprints of this or
any other article, contact
Reprints@BioTechniques.com

Titration of Non-Occluded Baculovirus Using a Cell Viability Assay

BioTechniques 34:260-264 (February 2003)

The insect cell-baculovirus system is a transient expression system in which the gene of the protein of interest is delivered to the insect cell by a recombinant baculovirus. It has been shown that the final concentration and the rate of expression of the recombinant protein are determined by the multiplicity of infection (MOI) employed (10,12). Accurate MOI can only be obtained when the baculovirus stock is titrated with a precise and reproducible method. Unfortunately, commonly utilized methods,

such as the endpoint dilution assay, have a very high variability. This variability is inherent to biological entities, but it is also a result of the qualitative evaluation methods used for identifying infected cells, especially when a reporter protein, such as β -galactosidase, is not available. Such qualitative evaluation methods are based on the subjective differentiation of infected from uninfected cells, which can only be accurately performed by highly trained personnel on a labor-intensive task. The variability of virus titrating assays has been recognized by regulating agencies, which accept variations of viral titers of $\pm 0.5 \log_{10}$ (4). Reducing the subjectivity and variability of virus titrating assays would increase the reproducibility between runs infected with different viral stocks. Accurate virus titration is especially relevant in production strategies where two or more recombinant baculoviruses (each encoding for a different protein) are simultaneously used, such as in virus-like particle production. In particular, it has been shown that the stoichiometry between the recombinant proteins depends on the ratio between MOIs of each baculovirus (10,12).

Several fast and less subjective methods for baculovirus titration have been proposed. Most rely on a reporter protein, such as GFP or β -galactosidase, for identifying infected wells in endpoint dilution assays (1,13). However, a reporter protein is not always available or desirable. Others rely on the use of antibodies against baculoviral proteins and require expensive immunoreagents not widely available (5). In this work, virus titration was performed utilizing a viability assay based on the cleavage of the tetrazolium ring of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) by a mitochondrial dehydrogenase in viable cells (8). The resulting product, a magenta water insoluble formazan salt, allows the objective quantification of viable cells through the use of a spectrophotometer. Because the baculovirus is a lytic virus, it can be expected that infection will reduce cell growth. Such a reduction should be dose-dependent and can be estimated by measuring the viable cell concentration using MTT and can be correlated to the viral titer. MTT viability assays

have been previously used for the titration of virus, [e.g., rotavirus (3)] or for titrating antiviral compounds (6,11).

The first step for the setup of the assay was to obtain a curve of viable cell concentration against the absorbance of the formazan salt produced. Exponentially growing Sf9 insect cells (ATCC CRL1711) with a viability higher than 95% were used in all assays. From 1×10^3 to 2×10^6 viable cells per well were seeded in flat-bottomed 96-well plates in 50 μ L Sf900II medium (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). MTT stock solution (10 μ L; 5 g/L) was added to each well. Plates were incubated in agitation for 2 h, centrifuged at $2000 \times g$ for 10 min in an Eppendorf® 5810R centrifuge (Hamburg, Germany), and the supernatants were discarded. The magenta salt crystals were solubilized with 50 μ L DMSO or acidified isopropanol (0.1 M HCl). As crystals were solubilized faster in DMSO and isopropanol was volatile, DMSO was used in all subsequent assays. Absorbance was measured at 570 nm in a microplate reader (model 550; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The assay proved to be linear ($\text{abs} = 8 \times 10^{-6}x + 0.0147$, $R^2 = 0.9952$, where x is viable cell concentration) at cell concentrations below 50,000 cells/well. From this result, it was decided to seed 5×10^3 cells/well for titration assays. Such low initial cell concentration allowed that the response remained linear even if cell growth occurred during the incubation time.

Viral stocks of three different recombinant baculoviruses (*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus) were titrated using the proposed method. They contain the genes for human placental secreted alkaline phosphatase (SeAP, kindly donated by Dr. Alan Wood, BTI, Cornell University, Ithaca, NY, USA), VP6 of rotavirus SA11 (kindly donated by Dr. S. López, IBT-UNAM, Mexico), and the fused gene of GFP and VP2 of rotavirus (kindly donated by Prof. J. Cohen, INRA, France) (2). All recombinant genes were under control of the *polh* promoter. Two plates were used for the titration of each viral stock. Ten microliters of serial dilutions of the viral stock (from 1 to 1×10^{-10}) were added to the plates, using 16 wells/dilution and 16 wells as uninfected controls. Six days after infection,

Benchmarks

plates were treated as described for the viable cell concentration curve. Figure 1 shows mean values and standard deviations of data obtained from three independent assays of the SeAP viral stock. It can be observed that the results obtained in the three assays were very similar. To determine the $TCLD_{50}$, data were adjusted using Sigmaplot 5.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) to the following equation of a sigmoid curve:

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

where Y is absorbance, Y_0 is the minimum absorbance (minimum viable cell concentration detected, 100% of the response), a is the maximum absorbance (0% of the response), D is dilution, D_0 is the dilution at which the response was 50% ($1/TCLD_{50}$), and b is a slope factor. The line in Figure 1 depicts the curve obtained from the model, which represented the data with a confidence level higher than 99%, according to an analysis of variance. To obtain the value of $TCLD_{50}/\text{mL}$, the following equation can be used:

$$TCLD_{50}/\text{mL} = \frac{1}{D_0 V} \quad [\text{Eq. 2}]$$

where V is the volume of viral dilution added per well. Determination of the

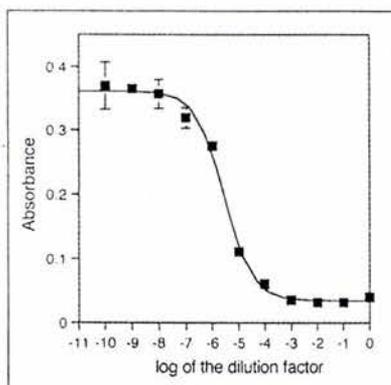


Figure 1. Proposed MTT colorimetric method for baculovirus titration. Each point represents the mean value of three independent determinations. Error bars represent the standard deviation between the experiments. In some cases, the error bars are smaller than the symbols shown. The continuous line represents the best fit to Equation 1, as determined from the least squares method. The values of parameters in Equation 1 for the data shown are a , 0.33; b , 0.8; D_0 , 2.8×10^{-6} ; and Y_0 , 0.03.

$TCLD_{50}/\text{mL}$ for each independent set of data resulted in an average value of 3.6×10^7 , with a standard deviation of 5.2×10^6 . That is, the standard deviation obtained was of $\pm 14\%$. Results obtained with the other viral stocks were similar to those shown in Figure 1, with standard deviations ranging from 10% to 30%, much less than what is typical in other titration assays (4,7).

Endpoint dilution and MTT assays were performed in parallel to compare the results obtained from the proposed method with those from traditional methods. For the endpoint dilution assay, 37 500 cells in 50 μL were added per well along with 10 μL serial dilutions of the GFP-VP2 viral stock. Twenty-four wells were used for each dilution. After four days of incubation, infected wells were identified by the fluorescence of GFP in an Eclipse TE3000 inverted microscope (Nikon, Tokyo, Japan) with a Nikon B-2A filter. The tissue culture infectious dose (TCID) for 50% of the wells to become infected was determined by the Reed and Muench method (9). Figure 2 shows results obtained using the endpoint dilution and the MTT assays. A linear relation with a high correlation coefficient was consistently obtained between $TCLD_{50}$ and $TCID_{50}$, although the former was lower than the latter. Identical $TCLD_{50}$ and $TCID_{50}$ values were obtained when the incubation time of the MTT assay was increased to 14 days. Nonetheless, with a six-day incubation period, reliable

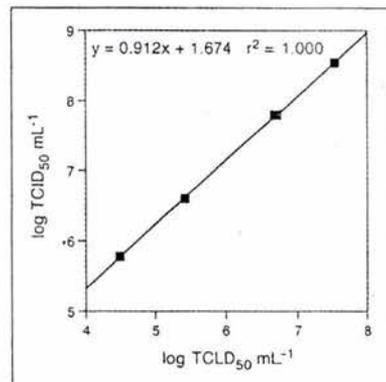


Figure 2. Correlation between $TCLD_{50}$ values obtained from the proposed MTT assay and $TCID_{50}$ values obtained from endpoint dilution assays. The equation represents the linear regression between both data.

results were obtained with the convenience of a shorter assay time (see correlation in Figure 2). For the calculation of virus titers in plaque-forming units (pfu), $TCLD_{50}/\text{mL}$ values were converted to $TCID_{50}/\text{mL}$ and then to pfu/mL by the following equations:

$$\log TCID_{50}/\text{mL} = 0.912(\log TCLD_{50}/\text{mL}) + 1.674 \quad [\text{Eq. 3}]$$

$$\text{pfu}/\text{mL} = TCID_{50}/\text{mL} \times 0.69 \quad [\text{Eq. 4}]$$

Equation 3 was obtained from the linear regression shown in Figure 2. The factor of 0.69 has been derived previously for converting $TCID_{50}/\text{mL}$ into pfu/mL (9).

The proposed MTT method has been used extensively in our laboratory. The proposed MTT assay gave reproducible results with all the recombinant baculoviruses tested. Moreover, the proposed assay was less labor intensive than traditional methods, and the result relied on objective absorbance readings. In addition, the availability of continuous (different values in the range of 0% to 100%) rather than only discrete data (positive or negative) allowed the use of all the information for the statistically significant determination of viral titers. The proposed MTT method allowed the accurate titration of viral stocks in which no reporter protein is present. To our knowledge, this is the first report in which a method of this type is proposed for titration of baculovirus. With this method, we have been able to manipulate accurately the concentration of recombinant proteins that constitute the rotavirus-like particles by manipulating the MOI.

REFERENCES

1. Cha, H.J., T. Gotoh, and W.E. Bentley. 1997. Simplification of titer determination of recombinant baculovirus by green fluorescent protein marker. *BioTechniques* 23:782-786.
2. Charpilienne, A., M. Nejmeddine, M. Berois, N. Perez, E. Neumann, E. Hewat, G. Trugnan, and J. Cohen. 2001. Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *J. Biol. Chem.* 276:29361-29367.
3. DiStefano, D., S. Gould, M. Sonal, and D. Robinson. 1995. Titration of human-bovine rotavirus reassortants using a tetrazolium-based colorimetric endpoint dilution assay. *J. Virol. Methods* 55:199-208.
4. Food and Drug Administration. U.S. De-

Benchmarks

- partment of Health and Human Services. 1998. Guidance for Industry. Q5A Viral Safety Evaluation of Biotechnology Products Derived from Cell Lines of Human or Animal Origin, p. 27-28.
5. Kwon, M.S., T. Dojima, M. Toriyama, and E.Y. Park. 2002. Development of and antibody-based assay for determination of baculovirus titers in 10 hours. *Biotechnol. Prog.* 18:647-651.
 6. Kodama, E., S. Shigeta, T. Suzuki, and E. De Clercq. 1996. Application of a gastric cancer cell line (MKN-28) for adenovirus screening using the MTT method. *Antiviral Res.* 31:159-164.
 7. LaBarre, D.D. and R.J. Lowy. 2001. Improvements in methods for calculating virus titer estimates from TCID₅₀ and plaque assays. *J. Virol. Methods* 96:107-126.
 8. Mosmann, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods* 65:55-63.
 9. O'Reilly, D.R., L.K. Miller, and V.A. Luckow. 1994. *Baculovirus Expression Vectors: A Laboratory Manual*. Oxford University Press, New York.
 10. Palomares, L.A., S. López, and O.T. Ramírez. 2002. Strategies for manipulating the relative concentration of recombinant rotavirus structural proteins produced by insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* 78:635-644.
 11. Sudo, K., K. Konno, T. Yokota, and S. Shigeta. 1994. A sensitive assay system screening antiviral compounds against herpes simplex virus type 1 and type 2. *J. Virol. Methods* 49:169-178.
 12. Tsao, E., M. Mason, M. Cacciuttolo, and S. Bowen. 1996. Production of parvovirus B19 vaccine in insect cells co-infected with double baculovirus. *Biotechnol. Bioeng.* 49:130-138.
 13. Yahata, Y., S. Andriole, K.J. Isselbacher, and T. Shioda. 2000. Estimation of baculovirus titer by β -galactosidase activity assay of virus preparations. *BioTechniques* 29:214-215.

Financial support by DGAPA-UNAM IN216100 and CONACYT 33348-B and NC 230. Address correspondence to Dr. Laura A. Palomares, Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal. 510-3, Cuernavaca, Mor. 62250, México. e-mail: laura@ibt.unam.mx

Received 17 October 2002; accepted 2 December 2002.

Jimmy A. Mena, Octavio T. Ramírez, and Laura A. Palomares

Universidad Nacional Autónoma de México Cuernavaca, México

Extended Stability of *Taq* DNA Polymerase and T4 DNA Ligase at Various Temperatures

BioTechniques 34:264-268 (February 2003)

In biological research over the last generation, the importance of enzymes that copy, cut, or alter DNA in some way cannot be overestimated. Despite the extensive use of these enzymes in numerous technological applications, surprisingly little effort has been expended on how to best store and transport them. In 2000, Clark et al. (2) published evidence of long-term (12 months) stability of three different restriction enzymes at ambient temperatures and seven-day stability at room temperature for 23 different restriction enzymes. Their results contrast the commonly held belief that restriction enzymes are unstable and rapidly lose activity if not carefully maintained in a chilled environment. It is presumed that DNA-modifying enzymes need to be stored, shipped, and chilled or risk heavy losses of enzymatic activity. After reading of the extended activity of certain restriction enzymes at ambient temperatures, a question that comes to mind is whether or not other enzymes commonly used in a molecular biology laboratory are also stable at elevated temperatures. Here I tested the activity of T4 DNA ligase and *Taq* DNA polymerase, following storage of up to six months at -20°C, 4°C, room temperature (approximately 22°C), and 37°C.

The enzymes examined were *Taq* DNA polymerase in storage buffer A (5 U/ μ L; Promega, Madison, WI, USA) and T4 DNA ligase (1 U/ μ L; USB, Cleveland OH, USA).

T4 DNA ligase was stored at -20°C, 4°C, room temperature, and 37°C. Aliquots were removed and tested for activity at seven predesignated time points: one day, three days, seven days, 14 days, 28 days, three months, and six months. Before initiating the experimental trials, seven identical tubes of DNA ligase master mixture were created (one for each time point) and stored until use at -20°C. The DNA ligase master mixture contained λ DNA di-

gested to completion with the restriction enzyme *Hind*III and T4 DNA ligase buffer (USB). At each of the time points, nine microcentrifuge tubes (200 μ L) were set up and labeled. Each tube received 19 μ L of the master mixture (contains 1 \times ligase buffer and 1 μ g λ DNA) and either 1 μ L distilled water (negative control) or 1 μ L (1 U) T4 DNA ligase. The T4 DNA ligase from each storage temperature was dispensed into two tubes. One tube from each set was incubated at 16°C for 2 h; the other was incubated at 16°C for 18 h. Each ligation reaction (20 μ L total) included 1 U T4 DNA ligase and 1 μ g restriction enzyme-digested λ DNA.

Following the 16°C incubation, the samples were stopped by the addition of gel electrophoresis loading dye and stored at -20°C until analysis by gel electrophoresis. Twelve microliters of each sample were analyzed by standard 0.8% agarose gel electrophoresis. Gels were stained with ethidium bromide (1 mg/mL) for 30 min and destained in distilled water for 60 min.

Taq DNA polymerase was stored at -20°C, 4°C, room temperature, and 37°C. Aliquots were removed and tested for activity at seven predesignated time points: one day, three days, seven days, 14 days, 28 days, three months, and six months. Before initiating the experimental trials, seven identical tubes of PCR master mixture and seven identical tubes of human DNA were created (one set for each time point) and stored until use at -20°C. The human DNA was a crude preparation generated by a cheek cell wash and a Chelex[®] extraction as described by Bloom et al. (1). The PCR master mixture contained PCR buffer (Promega), MgCl₂, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, and three sets of PCR primers. The primers (HUMTH01, TPOX, and CSF1PO) are all well-studied primers in use in the human forensic DNA community (see http://www.cstl.nist.gov/div831/strbase/str_fact.htm for primer sequences and details). Each reaction consisted of the following: 2.5 μ L 10 \times PCR buffer, 2.5 μ L 25 mM MgCl₂, 4 μ L dNTP mixture (1.25 mM each dATP, dCTP, dGTP, and dTTP), 0.5 μ L each of the six primers (all at 50 μ M), 3 μ L DNA, 0.2 μ L (1 U) *Taq* DNA polymerase, and 9.8 μ L distilled water.

5.2. Localización celular de proteínas estructurales de rotavirus en CI-BV

Existe poca información sobre la localización de las proteínas de rotavirus en las células de insecto, y la información que se tiene no es por una observación directa sino por inferencia indirecta de resultados experimentales. El interés en la localización celular de las proteínas estructurales y las PPV's en el sistema CI-BV es identificar si las proteínas de rotavirus (VP2 y VP6) interactúan dentro de la célula para ensamblarse. Y si el ensamblaje sucede *in vivo*, determinar en qué lugar se lleva a cabo. Estas preguntas son relevantes para el diseño de estrategias de producción y más aún para el proceso de purificación. Algunos estudios han reportado la localización celular de las PPV's de diferentes virus. Rose *et al.* (1993) reportaron que, a las 72 h.p.i., las PPV's de papilomavirus humano se encontraban preferentemente ensambladas en el núcleo de células Sf9. A su vez, Kanesashi *et al.* (2003) reportaron que las PPV's del Simian Virus 40 (proteína VP1) también se localizan en el núcleo de las células Sf9.

5.2.1. Localización de VP6

Células High Five TM infectadas con bac VP6 a MDI 5 (ufp/célula) a 24 y 72 h.p.i. fueron analizadas mediante inmunofluorescencia.

En la **Figura 5.1.** se observa el patrón de localización de VP6. En las primeras 24 h.p.i. la proteína VP6 se difunde en el citoplasma y después de las 48 h.p.i. se estructura en forma fibrilar. En ese ensayo se utilizó un anticuerpo policlonal. Para confirmar el patrón fibrilar se realizó el mismo ensayo pero con un anticuerpo monoclonal anti-VP6.

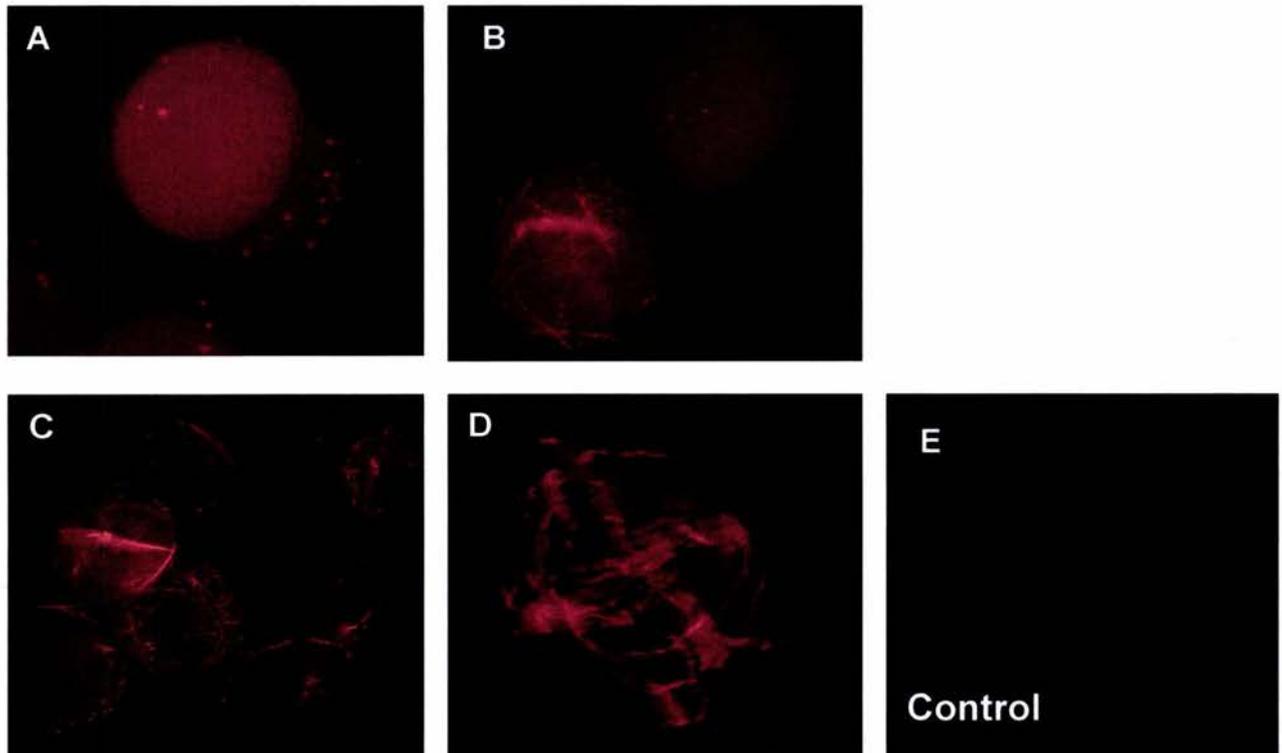


Figura 5.1. Inmunofluorescencia de células High FiveTM infectadas con bac VP6. Anticuerpo primario YM, anticuerpo secundario Alexa Fluor 568. **A)** 24 h.p.i. (60 X + 1 Zoom digital). **B)** 24 h.p.i. (60 X + 1.5 Zoom digital). **C)** 48 h.p.i. (40 X + 3 Zoom digital). **D)** 48 h.p.i. (60 X + 2.5 Zoom digital). **E)** Control sin infectar. Fotografías tomadas en microscopio de epifluorescencia.

En la **Figura 5.2.** se observó que evidentemente VP6 forma un patrón fibrilar dentro las células. El 100 % de las células infectadas con bac VP6 tenían este patrón a las 48 h.p.i. De esta localización de VP6 se podría inferir que posiblemente la proteína se asocia a alguna de las estructuras del citoesqueleto. Para corroborar o debatir esta posibilidad se hicieron ensayos donde se identificó la localización de VP6 y de tubulina.

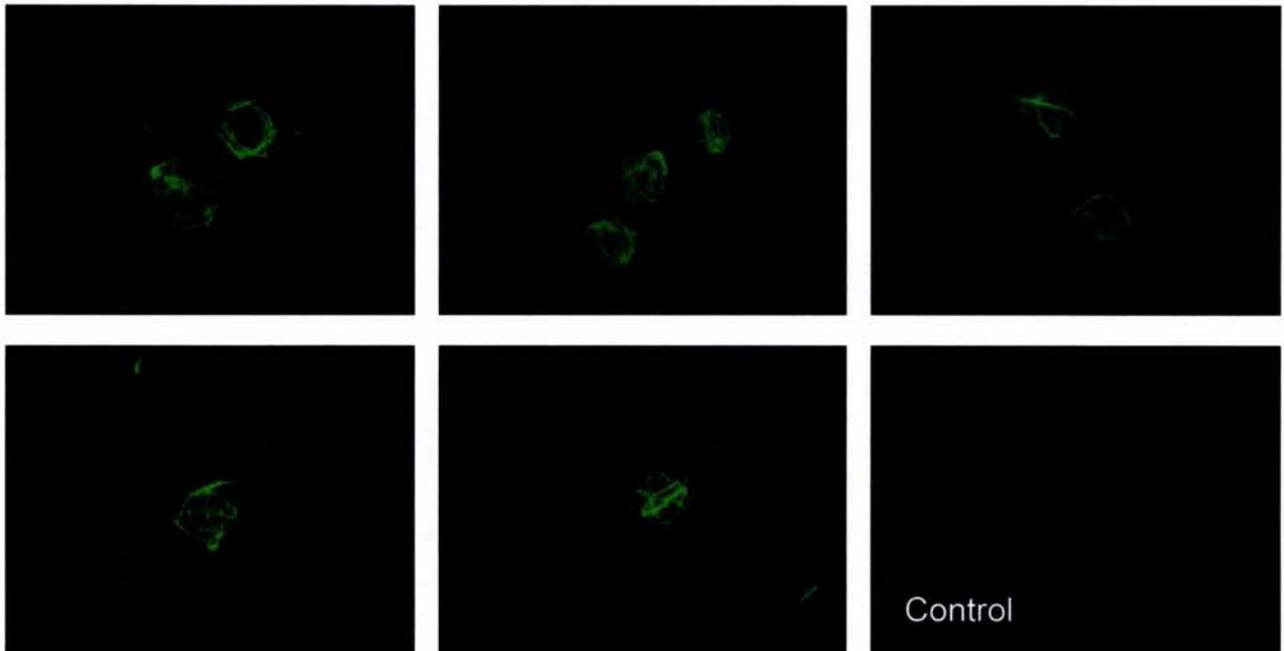


Figura 5.2. Inmunofluorescencia contra VP6 en células infectadas con bac VP6 a MDI de 5 (ufp/célula). Anticuerpo primario VP6, anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. Fotografías a 48 h.p.i. (40 X) tomadas en microscopio de epifluorescencia.

En la **Figura 5.3.** se observa que las fibras de VP6 no colocalizan con los microtúbulos de las células High FiveTM. Tanto en el control sin infectar como en las células infectadas se observó un patrón difuso en la tubulina. Este patrón difuso ya había sido reportado en células Sf9 por Kuriyama *et al.* (1994) y Dagget *et al.* (1998).

También se ha reportado que la infección por baculovirus reorganiza el citoesqueleto de las células. Estos arreglos pueden inducir una condensación de la actina y/o un patrón difuso en la tubulina (Roncaratti *et al.*, 1997; Sharp *et al.*, 1997; Dreschers *et al.*, 2001). Pero a su vez la sobreexpresión en el sistema de Cl-BV de proteínas que polimerizan y/o se asocian a microtúbulos puede generar patrones fibrilares similares a los observados con VP6 en la **Figura 5.3.A** (Kuriyama *et al.*, 1994; Sharp *et al.*, 1997; Frappier *et al.* 1999; Dagget *et al.*, 1998).

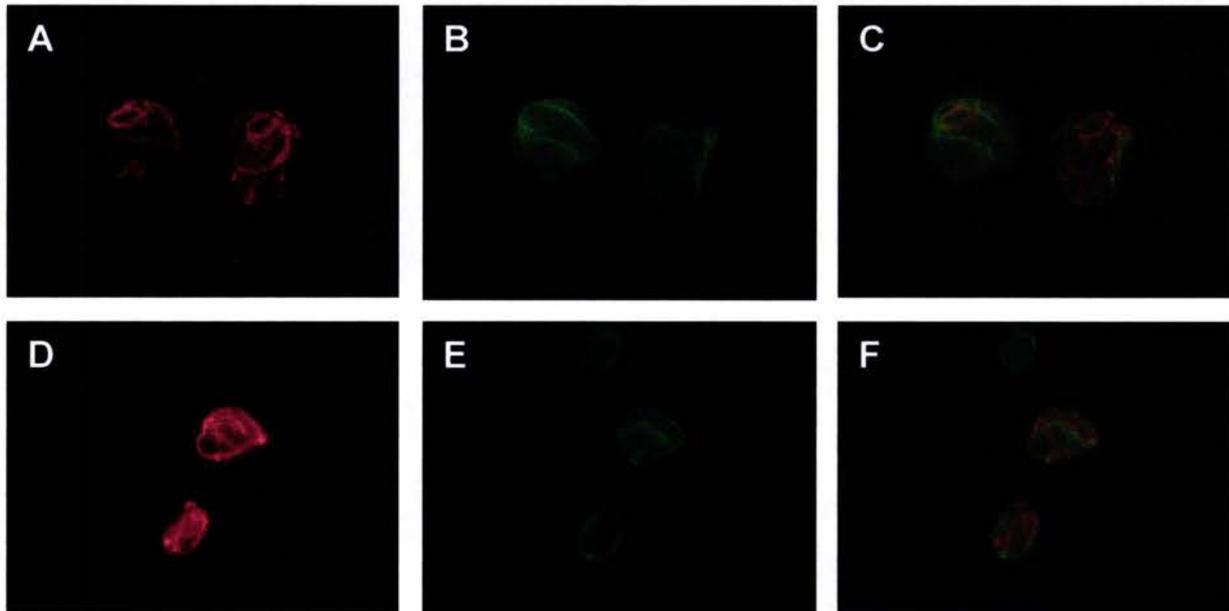


Figura 5.3. Localización de VP6 y Tubulina. VP6: anticuerpo primario YM, anticuerpo secundario Alexa Fluor 568. Tubulina: anticuerpo primario Tubulina, anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. **A)** y **D)** VP6 a 48 h.p.i.. **B)** y **E)** Tubulina a 48 h.p.i.. **C)** y **F)** Superposición de imágenes. Fotografías tomadas en microscopio de epifluorescencia (40 X 1 zoom digital).

VP6 es una proteína que presenta polimorfismo estructural dependiendo del pH y de la fuerza iónica (**Figura 5.4.B**). Inicialmente VP6 se ensambla en forma de trímeros, debido a una fuerte interacción hidrofóbica de su dominio H (parte superior). Posteriormente dependiendo del pH y la fuerza iónica del ambiente puede ensamblarse en esferas, túbulos (**Figura 5.4.A**) o pequeños agregados. VP6 se asocia en forma de túbulos a pH entre 6 y 8, y fuerza iónica entre 0-0.45 M. Las células de insecto tienen un sistema amortiguador de pH eficiente, que puede equilibrar diferencias de 1 unidad con respecto al pH extracelular. El pH fisiológico de las células de insecto sin infectar es 7.0 y en la infección puede llegar a ser alrededor de 7.1 (Medina *et al.*, 1995). El pH fisiológico y la alta capacidad de regulación del mismo por las células de insecto dan las condiciones

para que VP6 polimerice y forme posiblemente una estructura tubular (Mathieu *et al.*, 2001; Lepault *et al.*, 2001)

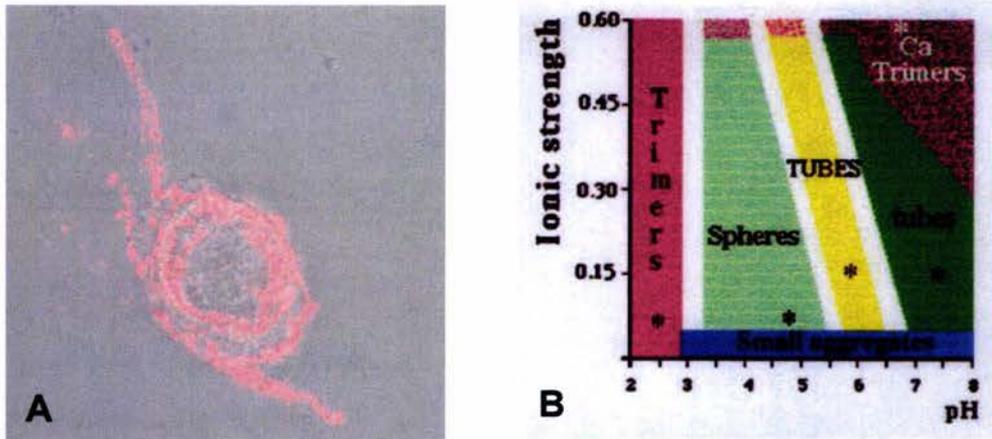


Figura 5.4. Formación de microtúbulos y polimorfismo de VP6. **A)** Túbulos de VP6 en el interior de célula High Five™ (Superposición de fotografía de contraste de fases e inmunofluorescencia. 60 X 1.5 zoom digital). **B)** Diagrama de fases de VP6 dependiente de pH y fuerza iónica (Molar) (Tomada de Lepault *et al.*, 2001).

5.2.2. Localización de GFPVP2 y VP2 (RF)

La formación de la nucleocápside (2 PPV) a partir de la proteína VP2 presumiblemente es el paso inicial en la formación de 2/6 PPV. Se ha reportado que la VP2 cuando se expresa en células de insecto se encuentra en la fracción insoluble del pellet celular (Labeé *et al.*, 1991, Palomares *et al.*, 2002). La función de VP2 además de formar el núcleo, es empaquetar y organizar el material genético, con dos proteínas más (VP1, VP3) al interior del núcleo (Estes y Cohen, 1989).

En inmunodetecciones hechas inicialmente (**Sección 5.3.2**) se observaba alta actividad proteolítica de las células High Five™ sobre las proteínas VP2 y GFPVP2. Estructuralmente la proteína VP2 consta de 880 aa. Los enlaces en el aa 92 y 132 son lugares sensibles a la acción de proteasas (Labeé *et al.*, 1991).

La región amino terminal es donde interacciona con VP1, VP3 y el RNA. Aprovechando que la región amino terminal no intervenía en el ensamblaje de la 2 PPV, Charpiliene *et al.* (2001) eliminaron los primeros 92 aa (punto accesible a proteasas) e insertaron en su lugar la proteína GFP de 238 aa. La inserción de la GFP no afectó el ensamblaje, sin embargo, dada la susceptibilidad a proteólisis de la proteína GFPVP2, fue necesario determinar si la señal obtenida a través de la fluorescencia de GFP corresponde a la proteína de fusión GFPVP2. Para determinar esto se realizó una inmunofluorescencia de VP2 y se comparó con la fluorescencia intrínseca de la GFP.

En la **Figura 5.5.** se observa la localización de la GFPVP2. En verde la fluorescencia emitida por la GFP y en rojo la fluorescencia emitida por el anticuerpo (Alexa Fluor 568) acoplado al policlonal contra las proteínas de rotavirus. En las **Figura 5.5.C** y **Figura 5.5.F** se observa al superponer las fotografías, que si colocan GFP y VP2. Esto indica que la observación de la GFP es representativa de la localización de GFPVP2.

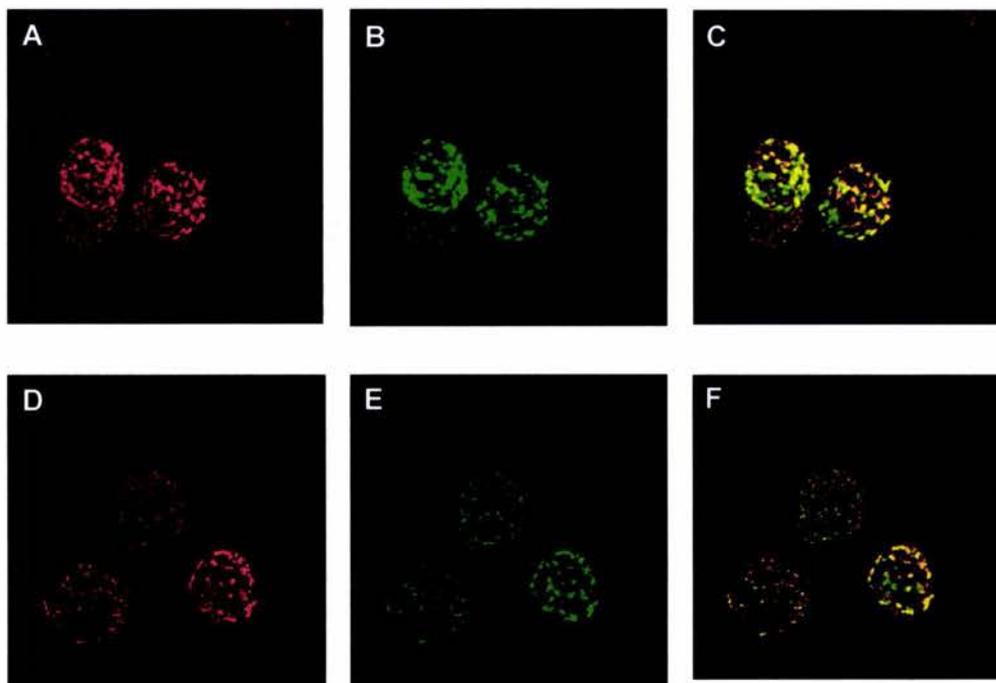


Figura 5.5. Localización celular de GFPVP2. Anticuerpo primario YM, anticuerpo secundario Alexa Fluor 568. A) y D) Inmunofluorescencia de VP2. B) y E) Fluorescencia intrínseca del segmento GFP de la GFPVP2. C) y F) Superposición de las imágenes. Fotografías tomadas en microscopio confocal (60 X).

Era aún necesario comprobar que la proteína de fusión tiene una localización igual de la proteína VP2 nativa. Se hicieron ensayos infectando con bac VP2 a MDI 5 (ufp/célula). La localización de VP2 se determinó con anticuerpos monoclonales y policlonales.

En la **Figura 5.6.** se observa que el patrón que forma VP2 (**Figura 5.6.A**) es similar al de la proteína GFPVP2 (**Figura 5.6.B**). Es un patrón granular probablemente distribuido en la membrana celular. Este resultado se observa tanto para el anticuerpo policlonal y monoclonal. Se analizaron cortes ópticos de células infectadas mediante microscopía confocal para discernir si GFPVP2 y VP2 están en la membrana celular. En la **Figura 5.7.** se observa el corte sagital (mitad de la célula), para células infectadas individualmente con GFPVP2 y VP2. En esas micrografías se observa que las proteínas (GFPVP2 y VP2) se encuentran formando un aro alrededor de la célula y no están presentes en el citosol. Este resultado indicaría que probablemente las proteínas se encuentren asociadas a la membrana celular.

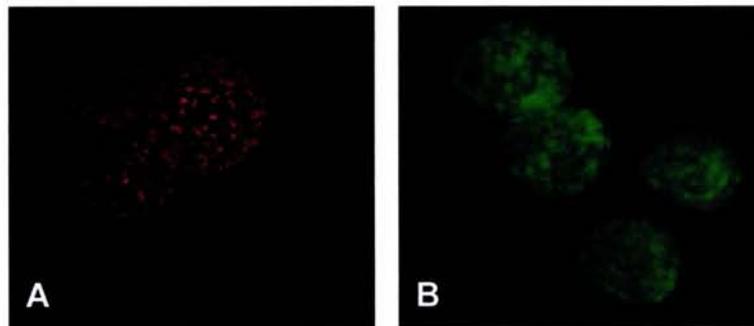


Figura 5.6. Células High Five TM infectadas con bac VP2 o bac GFPVP2 a MDI 5 ufp/célula. **A)** Inmunofluorescencia de VP2. **B)** Fluorescencia de GFPVP2. Fotografías tomadas en microscopio de epifluorescencia (60 X y 1.5 zoom digital).

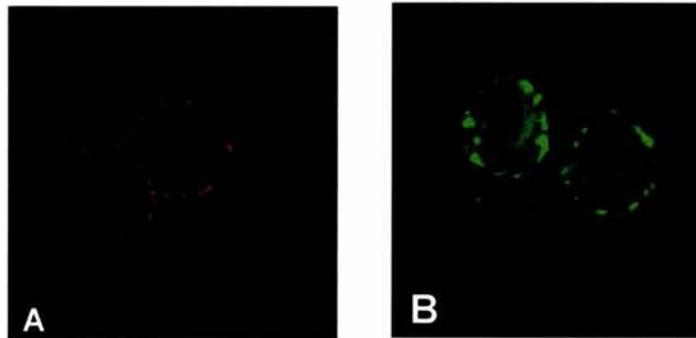


Figura 5.7. Cortes sagitales de células High Five™ expresando VP2 o GFPVP2. **A)** VP2. **B)** GFPVP2. Fotografías tomadas en microscopio confocal (60 X).

Se ha reportado que VP2 tiene la capacidad para adherir de manera no específica ácidos nucleicos. VP2 tiene dos “motifs” (Zipper de leucina) característicos de las proteínas que se adhieren a ácidos nucleicos por interacción hidrofóbica. Probablemente esta interacción hidrofóbica sea por la que VP2 se adhiere a la membrana celular (Labbé *et al.*, 1991).

5.2.3. Localización celular de VP6 y GFPVP2 en coinfecciones

Con el interés de observar si las proteínas VP2 y VP6 interactuaban cuando se coexpresan en una misma célula, se realizaron coinfecciones con bac VP6 y bac VP2 a MDI 5 ufp/célula cada uno, para identificar algún cambio en el patrón de localización comparado cuando se expresaron las proteínas VP6 y VP2 individualmente.

En la **Figura 5.8.** se observa que el patrón fibrilar que VP6 presentaba al 100% (**Figura 5.2**) cuando se expresaba independiente, cambió a un patrón granular. En esta imagen se contrasta con células que todavía tienen el patrón fibrilar para hacer más evidente el cambio de patrón a granular. Para comprobar si estos gránulos se encontraban en la membrana celular o en el citoplasma se hicieron cortes sagitales en confocal.

Se observa en la **Figura 5.9**, los gránulos de VP6 están dispersos por la célula. Esto probablemente indicaría acumulaciones de proteína VP6 disponibles para ensamblarse y/o tal vez 2/6 PPV's ensambladas.

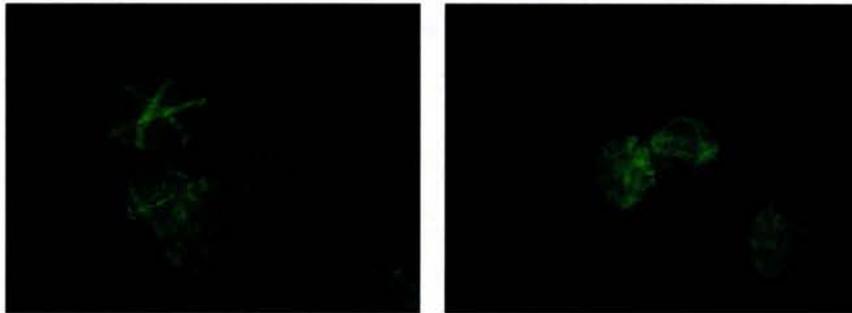


Figura 5.8. Localización de VP6 en células High Five™ coinfectadas con bac VP6 y bac VP2 a MDI 5 (ufp/célula). Anticuerpo primario VP6, anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. Fotografías tomadas en microscopio de epifluorescencia (40 X y 1.5 zoom digital).

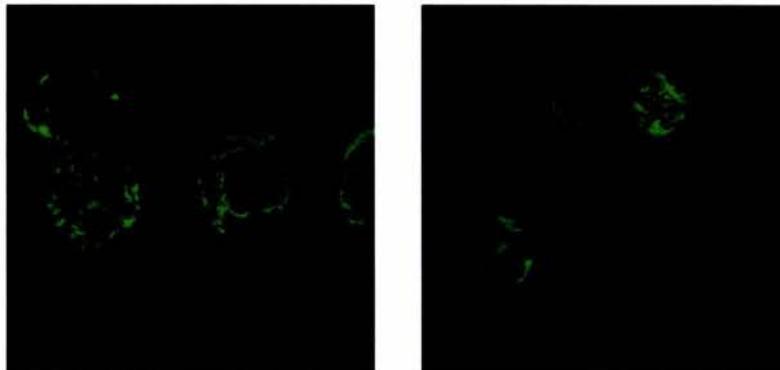


Figura 5.9. Cortes sagitales de células High Five™ coinfectadas con bac VP6 y bac VP2 a MDI 5 (ufp/célula). Anticuerpo primario VP6, anticuerpo secundario Alexa Fluor 488. Fotografías tomadas en microscopio confocal (60 X).

Para corroborar si la proteína VP6 al cambiar de patrón, colocaliza con la proteína VP2, se hizo el ensayo de inmunofluorescencia coinfectando con bac VP6 y bac GFPVP2. Mediante este ensayo en color verde se observó la fluorescencia de GFPVP2 y en color rojo la proteína VP6.

En la **Figura 5.10** se observan células infectadas expresando una o ambas proteínas (GFPVP2 color verde y VP6 color rojo). En la **Figura 5.10.A** y **Figura 5.10.D** se observan las células que expresaron la proteína VP6. En la **Figura 5.10.B** y **Figura 5.10.E** están las células que expresaron la proteína GFPVP2. Al superponer la imágenes (**Figura 5.10.C** y **Figura 5.10.F**) se observa que existe colocalización (de GFPVP2 y VP6) en las células que expresaron ambas proteínas (puntos amarillos). También se observa que el patrón granular de VP6 solo se presentó cuando se coexpresó con la proteína GFPVP2, porque en las células que no expresaron GFPVP2 la proteína VP6 conserva su patrón granular.

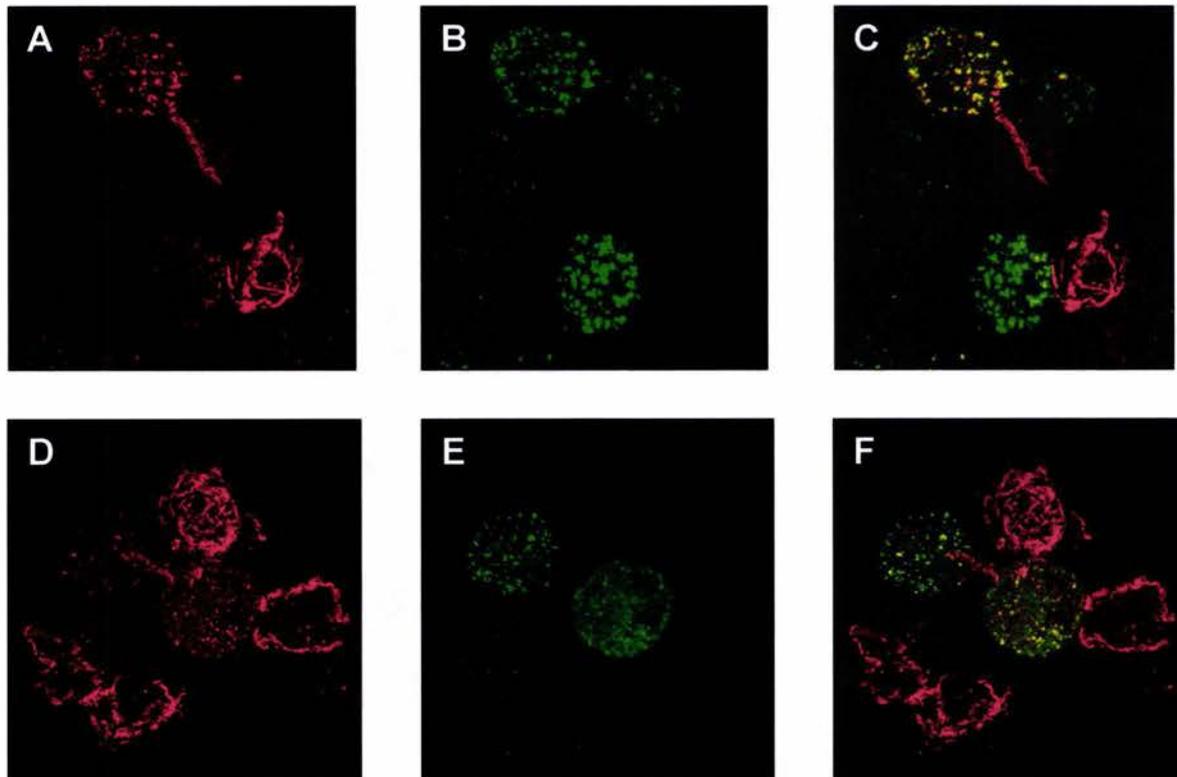


Figura 5.10. Células High Five[™] coinfectadas con bac VP6 y bac GFPVP2 a MDI 5 (ufp/célula) de cada virus. Anticuerpo primario VP6, anticuerpo secundario Alexa Fluor 568. **A**) y **D**) Inmunofluorescencia de VP6 **B**) y **E**) Fluorescencia intrínseca de GFPVP2. **C**) y **F**) Superposición de las imágenes. Fotografías tomadas en microscopio confocal (60 X).

La distribución de GFPVP2 en las células coinfectadas sigue siendo estrictamente granular, pero existen gránulos en el citoplasma y no solamente en las membranas como sucede cuando se expresa solamente GFPVP2.

Aunque estos resultados no son determinantes para inferir que el ensamblaje ocurre *in vivo*, se puede concluir que la coexpresión de GFPVP2 y VP6, alteran el patrón fibrilar de VP6 a un patrón granular distribuido en el citoplasma y la membrana celular. Como ya se enunció anteriormente, este nuevo patrón podría indicar una reorganización de la distribución de las proteínas estructurales en la célula, para facilitar el abastecimiento de subunidades en la formación de PPV's, siendo este un primer indicio del ensamblaje *in vivo* de las PPV's de rotavirus. Una de las perspectivas en trabajos futuros será la implementación de microscopía electrónica para concluir esta hipótesis.

5.3. Cinéticas de producción proteínas estructurales de rotavirus

La pseudo-partícula viral 2/6 (2/6 PPV) está conformada por 120 moléculas de la proteína VP2 y 780 moléculas de VP6. Las moléculas de VP2 forman una nucleocápside con geometría icosaédrica (T=1) de 50 nm (2 PPV). Las 780 unidades de VP6 inicialmente se estructuran en trímeros, obteniéndose 260 subunidades. Estas subunidades se acoplan encima de la nucleocápside (2 PPV) y la estructura final es 2/6 PPV (con simetría icosaédrica T=13) de 70 nm de diámetro (Estes y Cohen, 1989; Mathieu *et al.*, 2001). La producción de esta estructura estequiometricamente definida (2/6 PPV) puede ser optimizada en el sistema de CI-BV, como se enunció en la **Sección 2.2.4**. Pero inicialmente es necesario conocer el comportamiento cinético de la producción de las proteínas estructurales, el efecto de la MDI en la concentración de proteína y velocidad de producción, el tiempo de producción máxima de cada proteína, y si la proteína VP6 se difunde al sobrenadante.

5.3.1. Cuantificación *in vivo* de GFPVP2

La utilidad de la proteína GFPVP2 es que puede ser monitoreada *in vivo*, debido a la fluorescencia dada por la inserción de GFP. La proteína GFP está conformada por 238 a.a. (27 KDa). El cromóforo está constituido por los a.a. comprendidos entre Phe 64 y Gln 69 y su interacción con el Trp 57. La proteína debe estar correctamente plegada para que estas interacciones moleculares se lleven a cabo y flurezca (Yang *et al.*, 1996).

En la **Figura 5.11.** se observa el espectro obtenido de excitación y emisión de la EGFP (Molecular Probes, USA), que fue utilizada como estándar. La longitud máxima de excitación (λ_{EXC}) fue 484 nm y la de emisión (λ_{EM}) 510 nm.

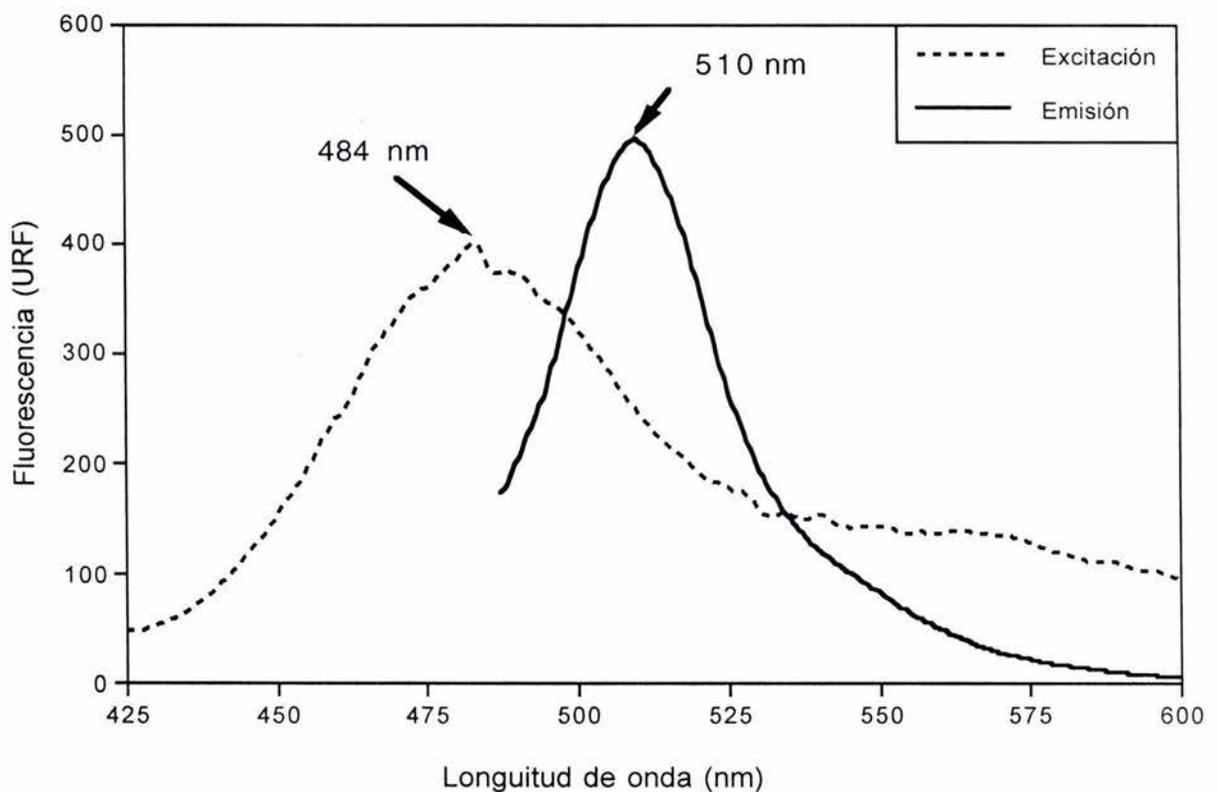


Figura 5.11. Espectro de excitación y emisión de EGFP.

La curva de estándar para determinar concentración se realizó en el rango de 1 ng/mL a 1000 ng/mL (37 pM-37 nM). El buffer utilizado para diluir la proteína fue Tris-EDTA pH 8.0. Para poder cuantificar al nivel picomolar fue necesario una apertura del fotomultiplicador de 20 nm (**Figura 5.12**).

En diferentes trabajos se ha logrado cuantificar GFP *in vivo*. Albano *et al.* (1998) cuantificaron en tiempo real la producción de GFP expresada en *E. coli* mediante espectrofluorometría. En células de plantas, mediante el uso de análisis de imágenes, se cuantificó la expresión de GFP bajo el efecto de diferentes promotores (Furtado y Henry, 2002). También fue posible monitorear la producción de GFP en cultivos de alta densidad de *E. coli* mediante la utilización de un sensor óptico de fluorescencia instalado en línea (Randers-Eichhorn *et al.*, 1997; DeLisa *et al.*, 1999).

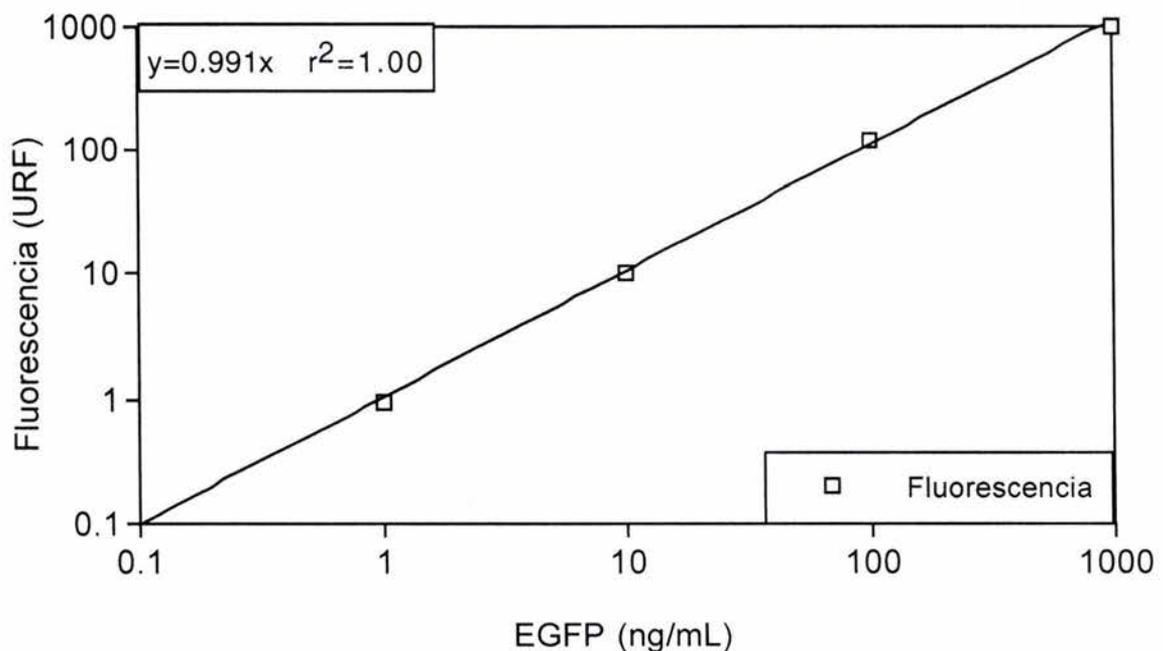


Figura 5.12. Curva de calibración de EGFP.

No existen al momento reportes de cuantificación *in vivo* de GFP en células animales para determinar la concentración de proteína (GFP o proteínas de

fusión). En la cuantificación (*in vivo*) de GFP en células animales existe el problema la dispersión de la luz por el tamaño celular. *E. coli* tiene un diámetro de partícula aproximadamente de 1 μm a 2 μm , mientras que las células High Five™ miden entre 15 μm y 25 μm (sin infectar e infectadas, respectivamente). La solución fue medir la proteína en una muestra diluida de células infectadas (500,000 células/mL) y restar el efecto de dispersión analizando a la misma concentración celular una muestra de células sin infectar. En la **Figura 5.13**. se observa el espectro de emisión de células infectadas con respecto a células sin infectar y el buffer. Este resultado demuestra una diferencia apreciable entre células infectadas y sin infectar. Además, la fluorescencia específica de GFPVP2 es dada por la GFP y esto se demuestra al comparar los coeficientes de extinción molecular a 488 nm de las proteínas GFPVP2 ($53000\text{-}55000\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) y GFP ($50600\text{-}55250\text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$) (Charpilliene et al., 2001; BD Living Colors User Manual, 2001). Por lo tanto fue posible cuantificar *in vivo* la producción de GFPVP2 en células de insecto.

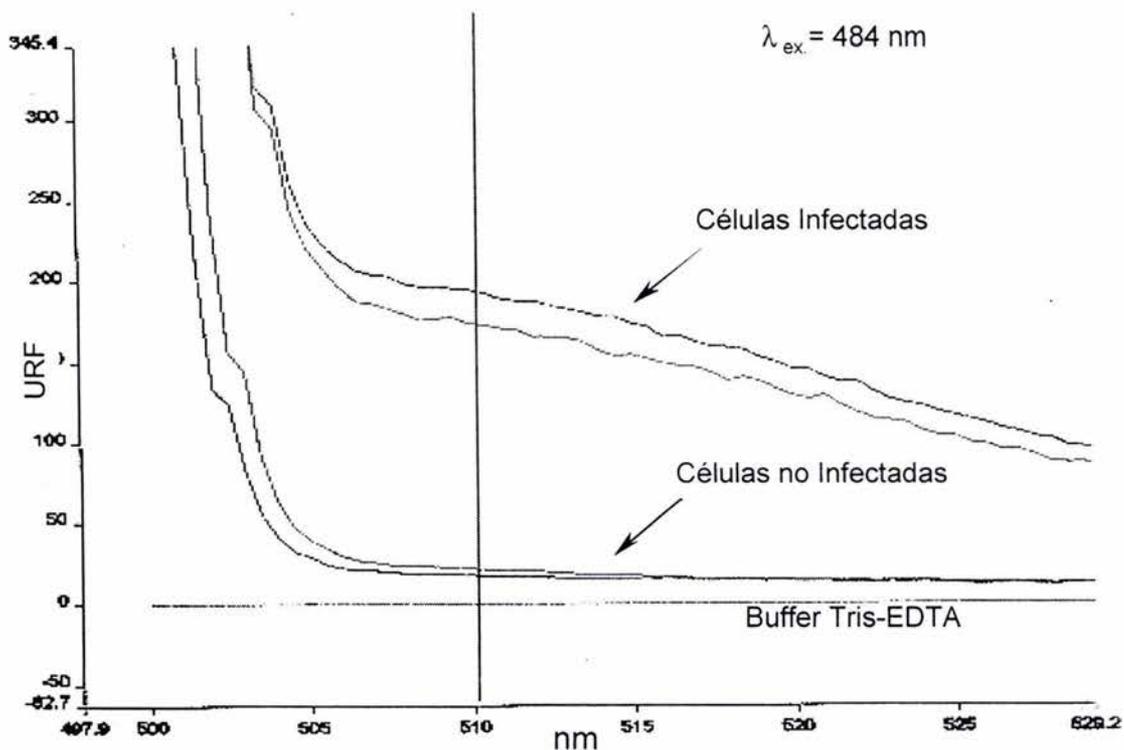


Figura 5.13. Espectro de emisión para la cuantificación *in vivo* de GFPVP2

Después de cuantificar la fluorescencia según **Materiales y Métodos**, se correlaciona la lectura con la **Ecuación 5.3.1** (correlación en **Figura 5.12**):

$$\text{ng GFP/mL} = \text{fluorescencia} / 0.991 \text{ (Ecuación 5.3.1)}$$

Para obtener la concentración de GFPVP2 se multiplicó la concentración obtenida por el factor másico 4.7. Este factor se obtiene de correlacionar la concentración de EGFP con la proteína GFPVP2 que tienen una relación molar 1:1 y los pesos moleculares correspondientes.

5.3.2. Cinéticas de producción de GFPVP2

Antes de analizar las cinéticas de crecimiento y producción de GFPVP2 y VP6, se caracterizó el crecimiento de las células High Five™ en cultivos sin infectar. Para la producción de GFPVP2 y VP6 se siguieron las condiciones de viabilidad, concentración celular y volumen de trabajo descritos en la **Sección 4.4**.

En la **Figura 5.14** se observa el comportamiento de una cinética típica de células High Five™. Entre las 48 h y 96 h es la etapa de crecimiento exponencial con una velocidad específica de crecimiento de 0.026 h^{-1} . Posterior a las 96 h es la etapa estacionaria. Aunque las cinéticas nunca tuvieron una duración mayor de 120 h, la etapa estacionaria puede durar hasta las 168 h (Ortega., 2003).

Es de notarse que no existe una fase Lag en estos cultivos. Esto se debe a que las células son cultivadas 24 h antes de iniciar el cultivo y se resuspenden en medio fresco cuando se inicia el experimento.

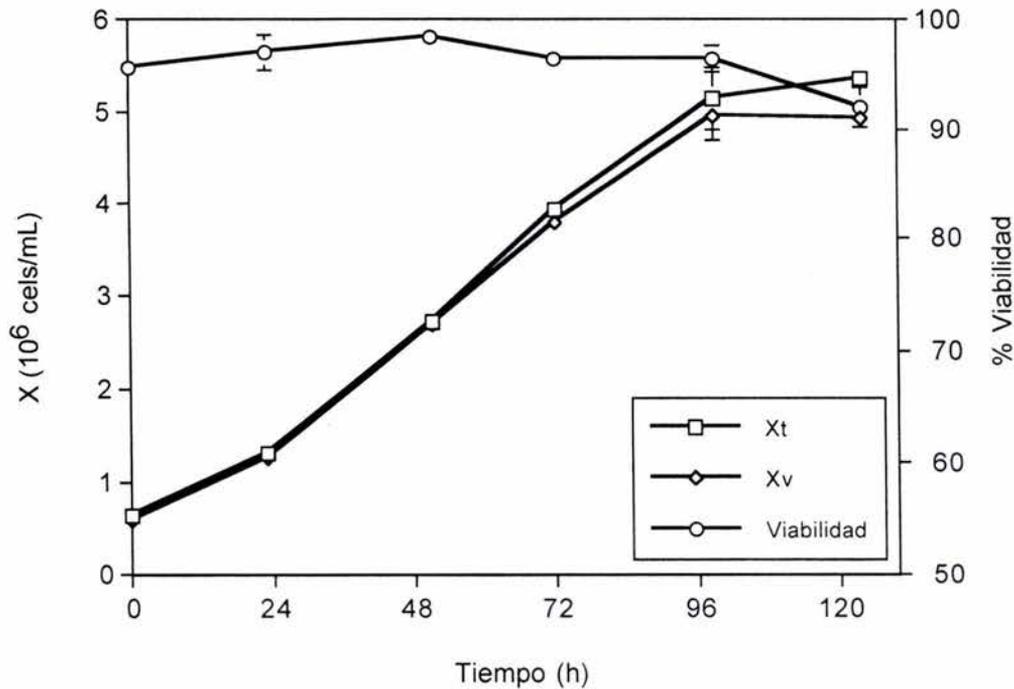


Figura 5.14. Cinética de crecimiento típica de células High Five™. Las barras de error son el resultados de experimentos por duplicado. En algunos casos la barra no se observa porque el error es mas pequeño que el símbolo.

Caracterizado el crecimiento celular de las células High Five™ se desarrollaron cinéticas de producción de GFPVP2 a diferentes multiplicidades de infección (1, 5, 10, 20 y 50 ufp/célula), con el objetivo de observar el efecto de la MDI en la producción y velocidad de producción de la proteína.

Dos aspectos relevantes fueron observados en estas cinéticas de producción. Como se muestra en la **Figura 5.15** a MDI bajas (1 y 5 ufp/célula) las células alcanzan a expandirse (1.95 y 1.45 veces respectivamente) durante las 24 h.p.i., mientras que a MDI altas (20 y 50 ufp/célula) no hay crecimiento celular posterior a la infección. Además que, independientemente de la MDI, a las 76 h.p.i. la concentración de células viables había disminuido drásticamente. El otro aspecto es referente a la viabilidad celular, que se observa una relación directamente proporcional entre la viabilidad celular y la MDI, aunque en todos los casos a las

76 h.p.i. la viabilidad fue 0% (MDI de 1 ufp/célula la viabilidad disminuyó de 90% a 0% en 24 h. **Figura 5.15**).

Este decremento en la viabilidad y concentración celular no puede atribuirse a un agotamiento de glucosa y glutamina, debido a que en condiciones similares de infección y en la misma línea celular el agotamiento de éstos sucede aproximadamente a las 144 h.p.i. (Ortega, 2003).

Existen diferentes clases de daños celulares causados por la infección de baculovirus. Entre éstos, el daño infligido a la integridad de la membrana citoplasmática por la infección viral (probablemente mayor a altas MDI) y otro es el efecto del virus en la célula huésped. Durante su replicación, transcripción y traducción, el baculovirus secuestra la maquinaria de síntesis de la célula, inhibiendo los fenómenos de replicación de los genes del huésped. Esto llega a causar el colapso celular por la falta de reparación a lo largo del cultivo (Miller, 1996).

En la **Figura 5.16** se observa las cinética de producción de GFPVP2 a diferentes MDI. A multiplicidades de infección de 1 y 5 ufp/célula se alcanza la mayor concentración de GFPVP2 (1139 ± 73 ng/mL, y 1190 ± 44 ng/mL respectivamente). Entre las MDI 1 a 20 ufp/célula, la velocidad inicial de producción de GFPVP2 (pendiente entre 0 y las 26 h.p.i de la **Figura 5.16**.) fue directamente proporcional a la MDI, pero a MDI 50 ufp/célula esta velocidad disminuye. Entre las MDI 1 y 20 ufp/célula, la cantidad máxima de proteína se alcanzó a las 52 h.p.i., pero a MDI 50 ufp/célula, GFPVP2 solamente se produjo durante las primeras 26 h.p.i.. Este resultado concuerda con lo reportado por Labbé *et al.*, (1991) en células Sf9, que marcando radiactivamente la proteína VP2 con [³⁵S] metionina, encontraron que la velocidad de producción fue máxima a las 48 h.p.i. y disminuyó drásticamente a las 72 h.p.i.. El cultivo se terminó a las 72 h.p.i. debido a que la viabilidad celular fue de 0 %.

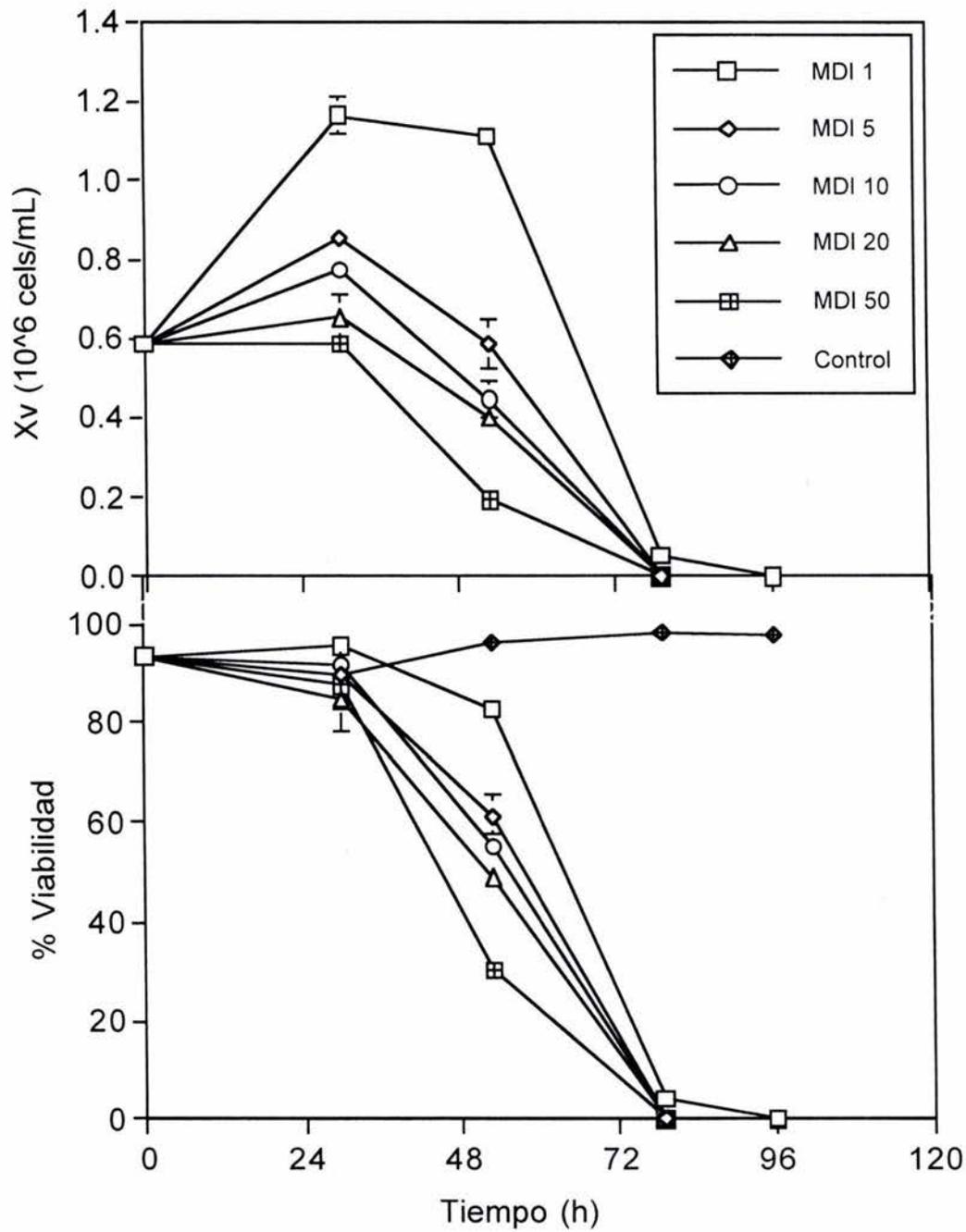


Figura 5.15. Cinética de crecimiento de células High FiveTM infectadas con bac GFPVP2 a diferentes MDI. Las barras de error son el resultados de experimentos por duplicado. En algunos casos la barra no se observa porque el error es mas pequeño que el símbolo.

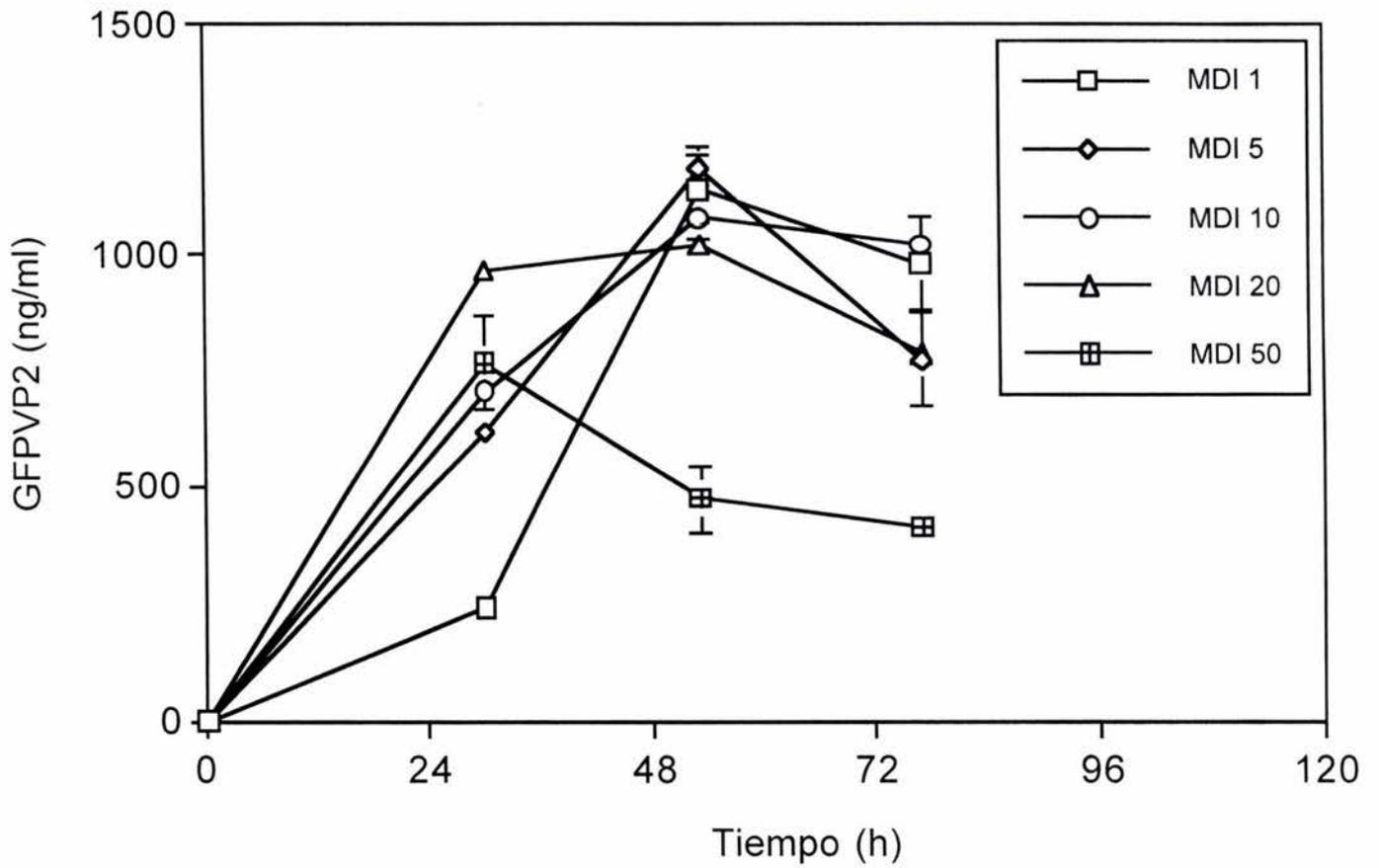


Figura 5.16. Efecto de la MDI en la producción de GFPVP2. Las barras de error son el resultados de experimentos por duplicado. En algunos casos la barra no se observa por que el error no es significativo y es ocultado por el símbolo

Posterior a las 48 h.p.i. se observó disminución en la cantidad de GFPVP2, debido probablemente a degradación proteolítica de la proteína. Martensen y Justenesen (2001) reportaron que, aunque las células High Five™ son altamente productivas en la expresión de proteína recombinante, también tienen una elevada actividad proteolítica (comparada con Sf9), esto en conjunción con la sensibilidad a proteólisis que reportó Labbé *et al.* (1991) para la proteína VP2. Esta degradación fue observada experimentalmente por inmunodetección. En la **Figura 5.17** se observa la degradación de la proteína GFPVP2 por las células H5. En todos los carriles se cargaron 10 µl del pellet celular, por lo que también se observa que la producción máxima se alcanza a las 48 h.p.i..

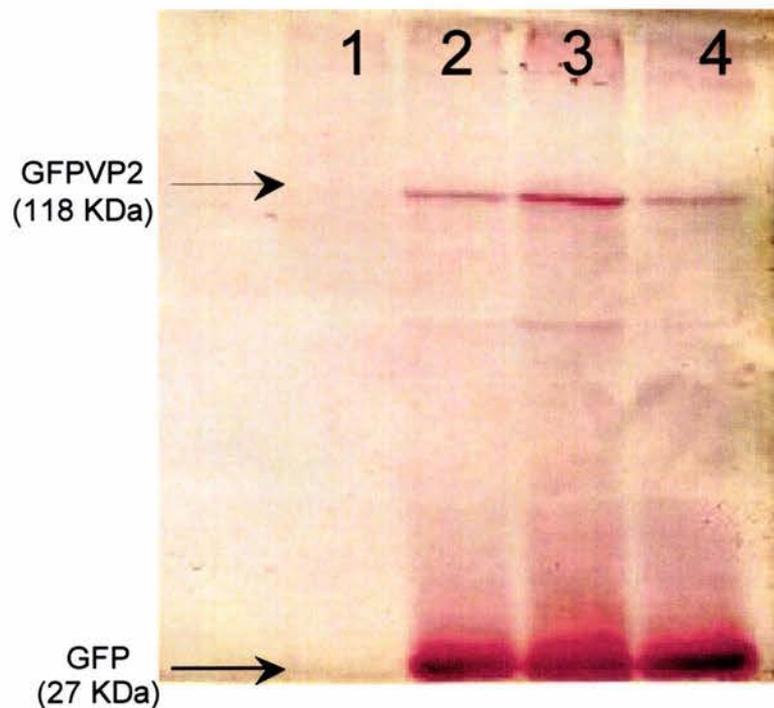


Figura 5.17. Degradación proteolítica de la proteína GFPVP2 en células de insecto. Anticuerpo GFP, Anticuerpo secundario acoplado peroxidasa y revelado con carbazol. Línea 1: células H5 a t=0. Línea 2: células H5 a t=24h. Línea 3: células H5 a t=48h. Línea 4: células H5 a t=72h.

5.3.3. Cinéticas de producción de VP6

En las cinéticas de crecimiento y producción de VP6 también se evaluó el efecto de diferentes multiplicidades de infección (1, 3, 5, 10, 20 y 50 ufp/célula). Al igual que en la producción de GFPVP2, la infección se hizo en células en fase exponencial de crecimiento a una concentración de 0.5×10^6 células/mL.

En la **Figura 5.18** se puede observar el efecto de la multiplicidad de infección en el crecimiento y viabilidad celular. En multiplicidades inferiores a 5 ufp/célula (1 y 3 ufp/célula) las células se expandieron 1.7 y 1.6 veces respectivamente durante las primeras 48 h.p.i.. A MDI 5 ufp/célula sólo se expandieron las primeras 24 h.p.i. (1.3 veces) y a MDI mayores de 5 ufp/célula no hubo expansión celular. Pero a diferencia de la infección con bac GFPVP2, el daño celular no fue tan acelerado, ya que la viabilidad celular decayó sólo a 60% en aproximadamente 96 h a las diferentes multiplicidades.

Esta relación entre la multiplicidad de infección y el crecimiento celular postinfección tanto para la infección con bac GFPVP2 y bac VP6 se puede explicar debido a que a MDI bajas ($MDI < 5$ ufp/célula) sólo una fracción de la población es infectada (infección primaria), mientras que el resto de la población sigue creciendo en la fase exponencial y posteriormente la producción de viriones a partir de la infección primaria infectan al resto de la población (infección secundaria, ver **Figura 2.5**) (Wong *et al.*, 1996). En cambio a $MDI > 5$ (ufp/célula) la totalidad de la población se infecta inmediatamente, llevándose a cabo una infección sincronizada (Power *et al.*, 1994; Wong *et al.*, 1996). Siguiendo el modelo probabilístico de Poisson a una MDI 1 (ufp/célula), la probabilidad de que una célula se infecte por lo menos con un baculovirus es de 63.3%, mientras que a MDI 5 (ufp/célula) este valor es de 96.6% (Palomares *et al.*, 2002).

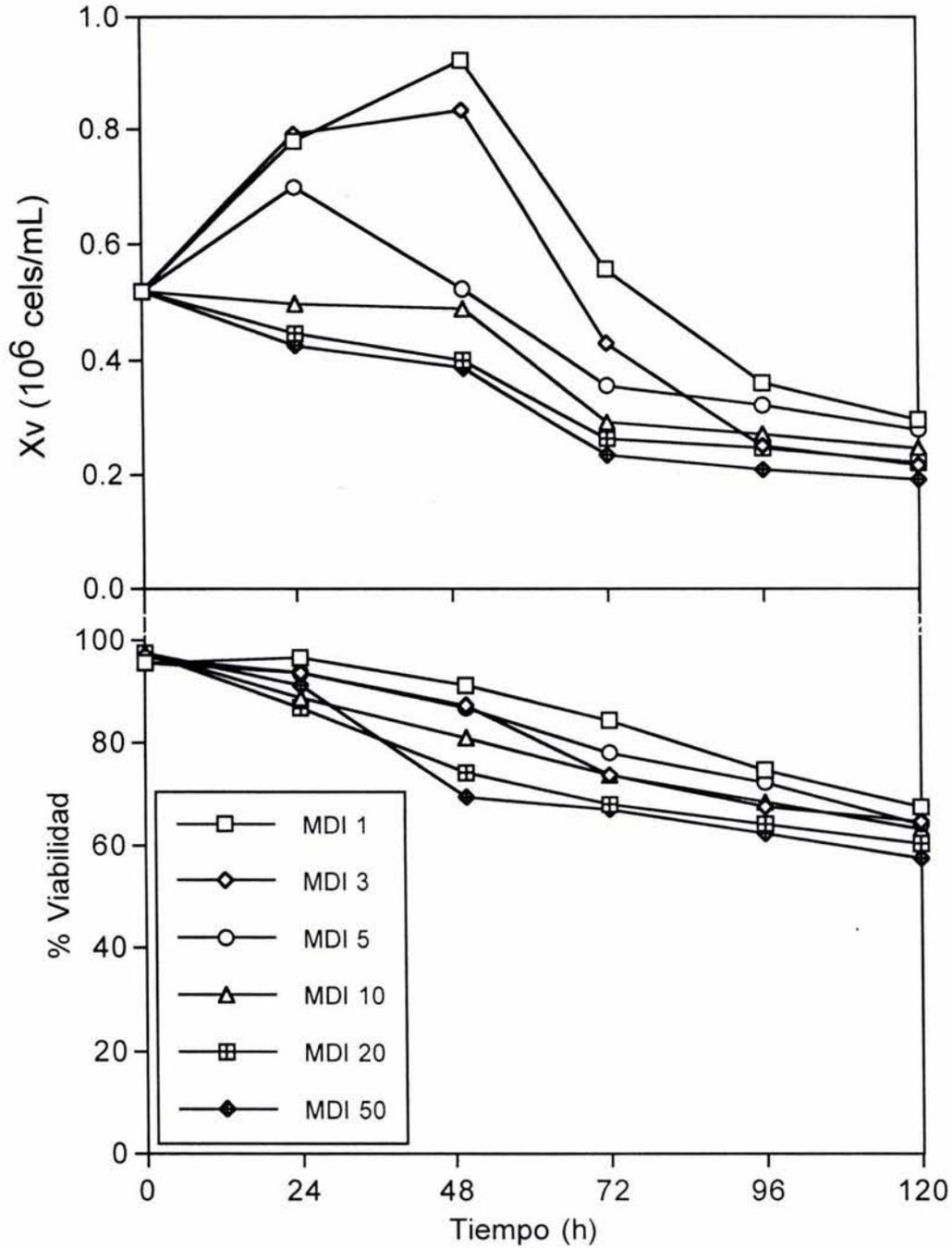


Figura 5.18. Cinética de crecimiento de células High Five infectadas con bac VP6 a diferentes MDI. Las barras de error son el resultados de experimentos por duplicado. En algunos casos la barra no se observa porque el error es mas pequeño que el símbolo.

En la **Figura 5.19** se observa que a MDI altas (5, 10, 20 y 50 ufp/célula) se presenta una velocidad inicial (24 h.p.i.) de producción de proteína mayor que a MDI bajas (1 y 3 ufp/célula). Aproximadamente el 33% de la producción total de proteína a MDI altas (5, 10, 20 y 50 ufp/célula) se alcanzó durante las primeras 24 h.. La velocidad inicial de producción a MDI mayores que 5 ufp/célula disminuyó después de las 48 h.p.i., en contraste con un aumento para MDI menores que 5 ufp/célula. También se observa que la producción de VP6 ocurrió durante las primeras 72 h.p.i., en contraste con GFPVP2 ocurrió sólo durante las 48 h.p.i..

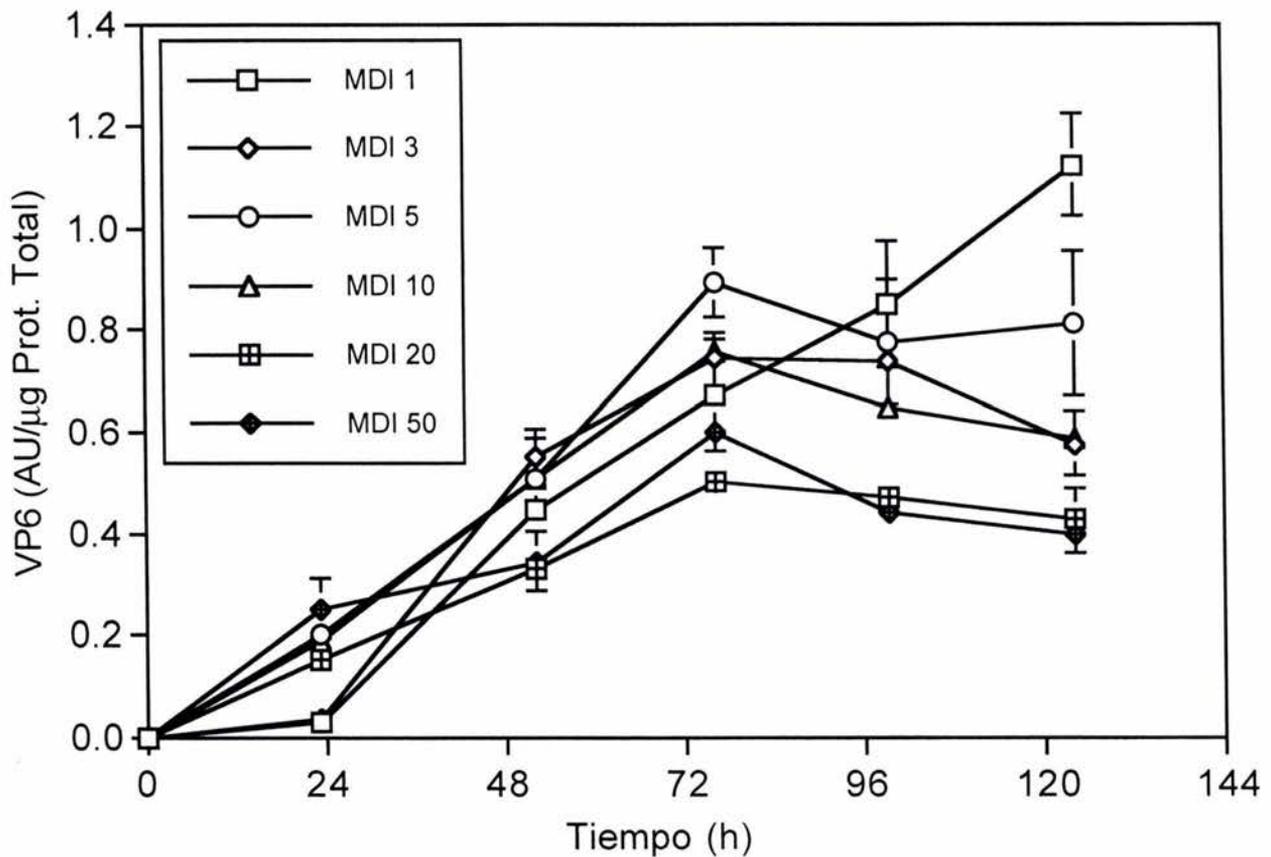


Figura 5.19. Efecto de la MDI en la producción de VP6 Las barras de error son el resultados de experimentos por duplicado. En algunos casos la barra no se observa porque el error es mas pequeño que el símbolo.

Otro aspecto observado en las cinéticas a diferentes MDI es la alta proporción de proteína presente en el sobrenadante. VP6 es una proteína citoplasmática que no se une a membrana en comparación con GFPVP2, por lo tanto en la lisis celular (infección viral) puede ser liberada al medio de cultivo (**Sección 5.2.1**). En la **Figura 5.20** se observa que en células infectadas a MDI 5 ufp/célula a las 72 h aproximadamente el 80% de la proteína se encuentra en el sobrenadante.

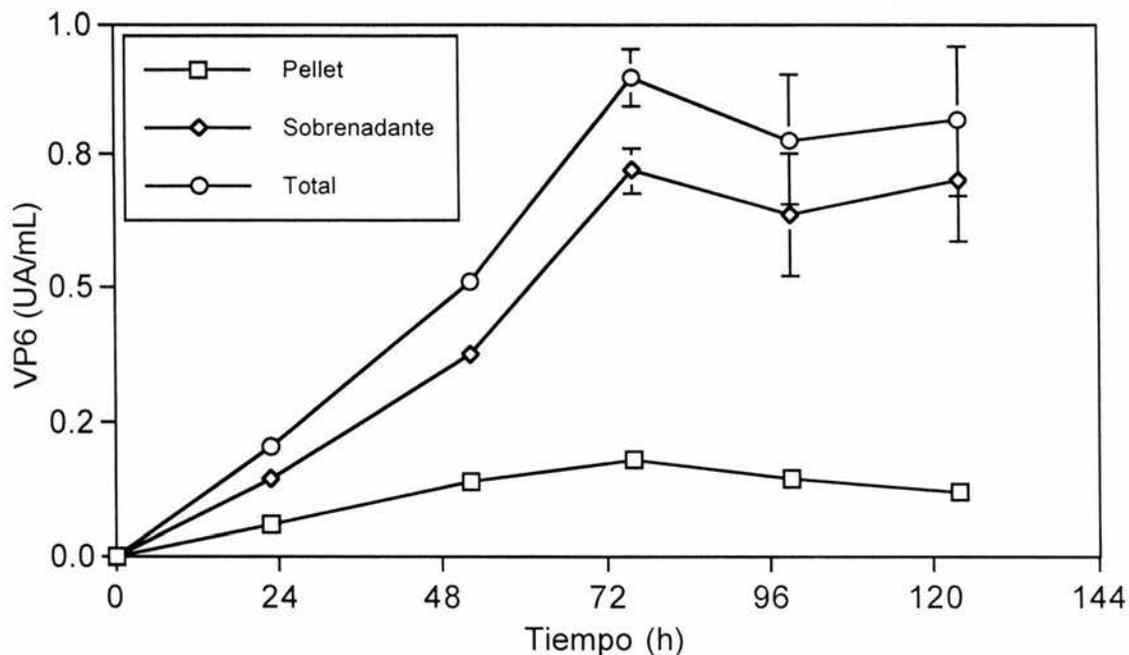


Figura 5.20. Distribución de proteína VP6 en sobrenadante y pellet celular en células High Five™ infectadas a MDI 5 ufp/célula. Las barras de error son el resultados de experimentos por duplicado. En algunos casos la barra no se observa porque el error es mas pequeño que el símbolo.

Lo anterior es relevante desde el punto del ensamblaje de 2/6 PPV. El primer paso es la formación del núcleo (2 PPV) por la proteína VP2. Posteriormente ya conformados los trímeros de VP6, estos se asocian sobre el núcleo y se ensamblan formando la pseudo-partícula viral 2/6. Por lo tanto es importante tener en cuenta que la proteína GFPVP2 se produce durante las primeras 48 h.p.i y que se encuentra asociada a la membrana celular. Además que la producción de la proteína VP6 es durante las 72 h.p.i y una proporción apreciable está en el

sobrenadante. En estas cinéticas fue posible hacer una cuantificación en unidades másicas de GFPVP2, pero no para la proteína VP6 que se reporta en unidades relativas (UA), entonces no se pueden comparar las concentraciones entre sí. Pero en el estudio desarrollado por Palomares *et al.* (2002) se cuantificó VP2 y VP6 en unidades relativas, por lo que son comparables sus concentraciones. En ese estudio se observó que la producción de VP6 a MDI 5 ufp/célula a las 48 h.p.i. (coinfeción con bac VP6 y bac VP2) es 10.4 veces mayor que la concentración de VP2 en ese mismo momento. Es posible que bajo el esquema de coinfección a igual MDI la producción de PPV's no sea eficiente.

5.3.4. Comparación en la producción de GFPVP2 y VP6 a diferentes MDI.

El análisis de los resultados anteriores demostraron que existe una diferencia en el patrón de localización y el tiempo de producción de las proteínas. Esto hace necesario el desarrollo de estrategias de coinfección (bac GFPVP2 y bac VP6) para optimizar el ensamblaje de la 2/6 PPV. Una estrategia posible es manipular la concentración y velocidad de producción de las proteínas mediante la manipulación de las MDI de cada baculovirus. Por ejemplo coinfectar a altas MDI con el bac GFPVP2 y a bajas MDI con el bac VP6, pero asegurando que exista una infección sincrónica (todas las células infectadas por lo menos de un baculovirus por cada proteína). Pero para definir cuales MDI y que relaciones entre MDI son indicadas es necesario analizar el efecto de esta variable. En la **Figura 5.21** se observa el efecto de la MDI en la producción de GFPVP2 y VP6. Para la proteína GFPVP2 la concentración máxima ($1190 \text{ ng/mL} \pm 44 \text{ ng/mL}$) se obtuvo a MDI 5 ufp/célula, pero no existió una diferencia significativa con respecto a MDI 1 y 10 ufp/célula en la concentración de proteína ($1139 \pm 73 \text{ ng/mL}$ y $1074 \pm 46 \text{ ng/mL}$). La relación entre expresión y MDI tiene un máximo a 5 ufp/célula y después decae progresivamente hasta la MDI de 50 ufp/célula. A MDI 50 ufp/célula la producción de GFPVP2 fue 36% menor con respecto a MDI 5 ufp/célula. Estos resultados son similares a los obtenidos por Palomares (1999) en la producción de VP2 en células Sf9. Palomares (1999) estudió en ese trabajo las

MDI de 1, 5 y 10 ufp/célula y obtuvo la concentración máxima de proteína a MDI 5 ufp/célula.

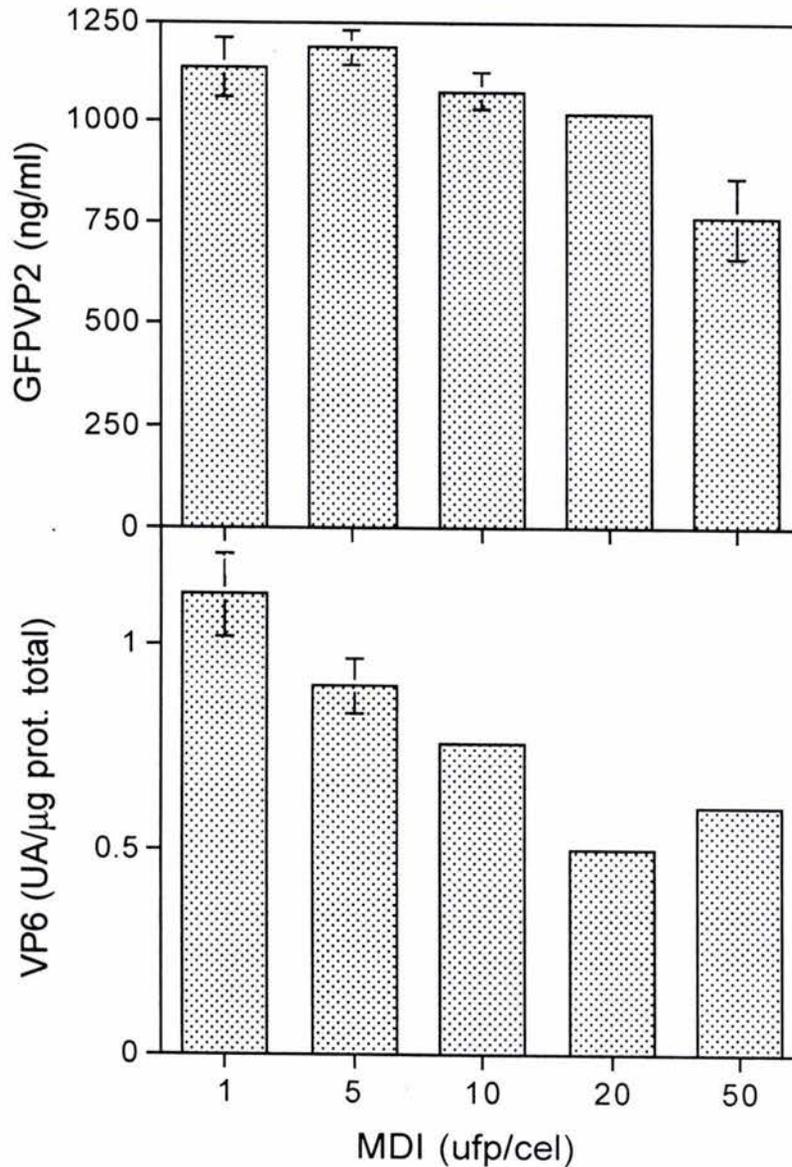


Figura 5.21. Relación la MDI y concentración máxima de proteína. Las barras de error son el resultados de experimentos por duplicado. En algunos casos la barra no se observa porque el error es mas pequeño que el símbolo.

Al producir VP6, a MDI bajas se obtuvo mayor concentración de proteína en comparación con MDI altas. A diferencia del efecto de la MDI en la producción de GFPVP2, a MDI 1 ufp/célula se alcanzó una concentración máxima de VP6 de 1.2

UA/ μ g proteína total, mientras que a MDI 5 ufp/célula disminuyó la concentración de VP6 en 20% y a MDI 20 ufp/célula en 55%.

Por medio del análisis de proteína máxima alcanzada (GFPVP2) no se logró observar un efecto de la MDI en la síntesis de proteína (solo fue significativo a MDI de 50 ufp/célula). Entonces se hace el análisis con respecto a la velocidad específica de síntesis de proteína.

En la **Figura 5.22** se observa el comportamiento de la velocidad específica máxima de producción con respecto a la MDI, tanto para GFPVP2 y VP6.

Para la proteína GFPVP2 se observó que existe una relación directamente proporcional entre la velocidad específica y la MDI. Este comportamiento ocurre hasta MDI de 20 ufp/célula, después de esta MDI la velocidad se mantiene constante. Aunque no se observó una variación significativa en la concentración de proteína máxima (**Figura 5.21**), en la velocidad específica de producción existe un aumento del 70% a MDI 20 ufp/célula con respecto a MDI 5 ufp/célula. Matemáticamente este resultado es lógico puesto que fueron menos células viables (MDI 20 ufp/célula) las que produjeron la misma cantidad de proteína. Biológicamente este comportamiento es debido a diversos factores: i) La velocidad de producción de una proteína depende de su peso molecular (bajo PM=alta velocidad y viceversa), este resultado fue observado por Palomares *et al.* (2002) en la producción de las proteínas de rotavirus, donde la velocidad específica de producción de VP6 (44 kDa) fue 10 veces mayor que la de VP2 (102 kDa). ii) La velocidad de producción puede aumentar al existir mayor número de copias de ADN viral (MDI altas), mientras no se sature la maquinaria celular. La suma de estos dos factores explican el comportamiento observado en la **Figura 5.22** para GFPVP2. Por tener la GFPVP2 una velocidad de producción menor (con respecto a VP6), esta velocidad es sensible a el aumento en el número de partículas virales que infectan una célula, y se observa que a MDI mayores de 20 ufp/célula el sistema está saturado, ya que no existió un aumento en la velocidad específica de síntesis.

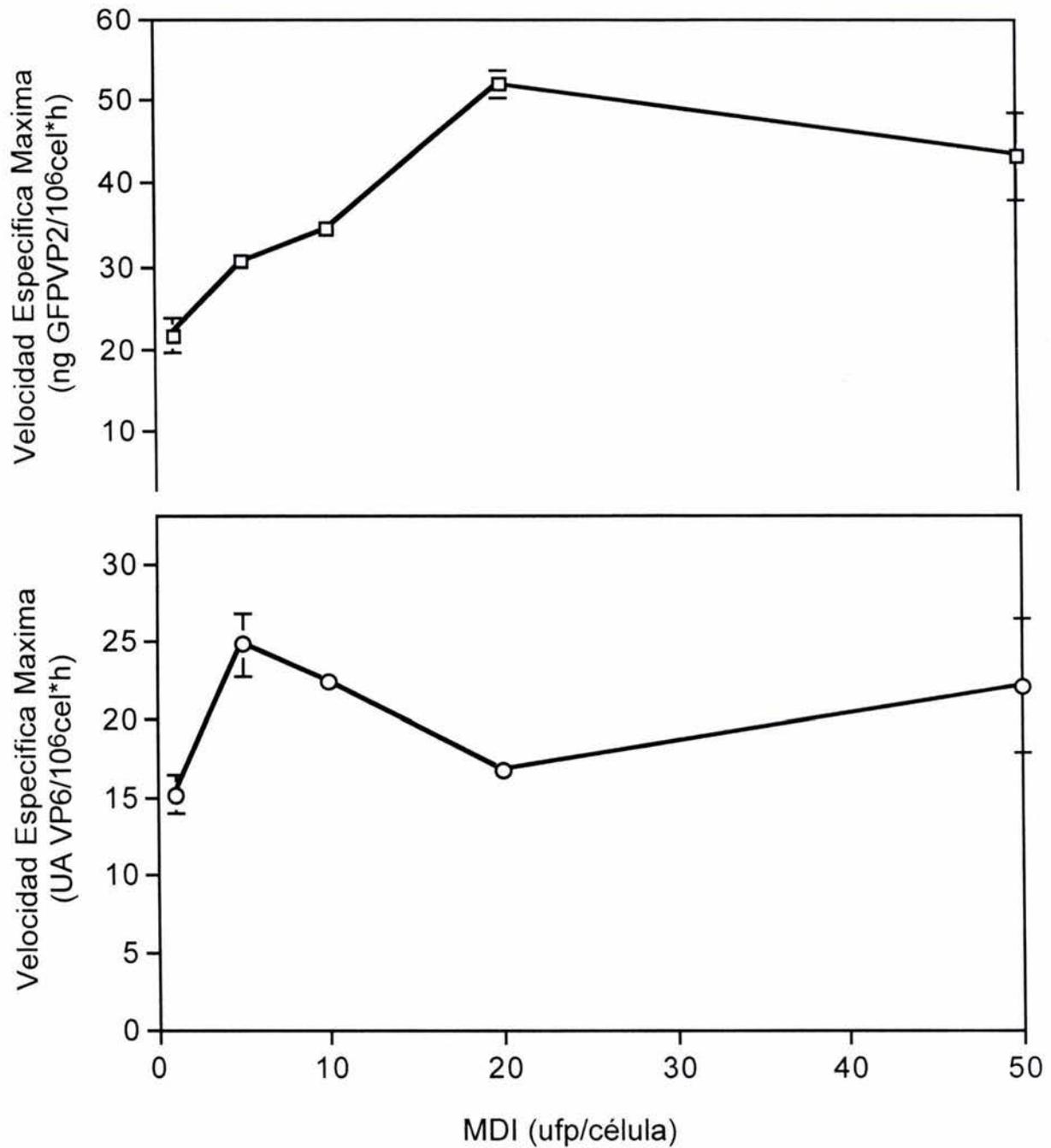


Figura 5.22. Velocidad específica máxima de producción de proteína a diferentes MDI. Las barras de error son el resultados de experimentos por duplicado. En algunos casos la barra no se observa porque el error es mas pequeño que el símbolo.

En lo referente a VP6 se observó que la saturación del sistema se alcanza a MDI 5 (ufp/célula). La máxima velocidad específica de producción es a MDI 5 (ufp/célula), 64% mayor con respecto a MDI 1 (ufp/célula). Probablemente este resultado se deba a que en el caso de VP6 (por ser su velocidad de producción mayor con respecto a VP2) el efecto de la MDI se ve disminuido. Aunque, con excepción de MDI 20 (ufp/célula), se observa que la velocidad se mantiene relativamente constante después de 5 ufp/célula.

Estos resultados indican que existe un comportamiento cinético diferente para cada proteína, que los tiempos de producción máximos difieren en 24 h aproximadamente y que es más sensible a la manipulación de la velocidad específica la proteína GFPVP2 que VP6, mientras que existe un comportamiento inverso en lo que respecta a la concentración máxima de proteína. Este conocimiento cinético permitirá generar estrategias de producción para optimizar la producción de PPV's.

5.4. Caracterización, cuantificación y purificación de PPV's por cromatografía líquida

La cromatografía líquida ha sido anteriormente implementada para el análisis, separación y purificación PPV's. Se han utilizado técnicas como fase reversa, intercambio iónico, permeación en gel y columnas de afinidad para el análisis y purificación de PPV's de Hepatitis B, papilomavirus, virus de la enfermedad infecciosa bursal (IBDV) y adenovirus (O'Keefe *et al.*, 1995; Shabram *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1998; Tleugabulova *et al.*, 1998; Cheng *et al.*, 2001).

Tleugabulova *et al.* (1998) reportaron que mediante cromatografía de permeación en gel fue posible analizar y separar las partículas ensambladas incorrectamente de las partículas de alta respuesta inmunológica (hepatitis B). Cheng *et al.* (2001) implementaron la cromatografía de afinidad para purificar las PPV's de IBDV, provenientes de un proceso a escala laboratorio (500 ml). Además reporta que el proceso de ultracentrifugación es ineficiente para la purificación de grandes cantidades de PPV's.

Las ventajas de la purificación de PPV's por medios cromatográficos con respecto a la ultracentrifugación son el bajo consumo de tiempo, energía, la reproducibilidad y objetividad en el proceso y la cuantificación. Además las muestras pueden ser eluidas en el buffer mas conveniente para su estabilidad estructural. Bertolotti-Ciarlet *et al.* (2002) reportó que el colchón de sacarosa, debido a la alta osmolaridad y viscosidad, puede desestabilizar la estructura de las PPV's, por el rompimiento de las interacciones electrostáticas de las partículas. En contraparte, una desventaja de la cromatografía líquida es el elevado consumo de buffer.

5.4.1 Caracterización de PPV's de rotavirus por cromatografía líquida

Para empezar a implementar la cromatografía líquida de permeación en gel (HPLC-GP) en el análisis de PPV's, se utilizaron PPV's obtenidas de la coinfección con MDI 5 (ufp/célula) de ambos baculovirus. Las PPV's fueron purificadas por gradientes de CsCl como se describe en **Materiales y Métodos**.

En la **Figura 5.23** se observa el análisis de las bandas obtenidas a partir del pellet celular. Las bandas B1 y B2 contienen las proteínas GFPVP2 y VP6, mientras que en la banda B3 no se logró determinar la presencia de alguna de las proteínas (concentración de proteína por debajo del límite de detección). No obstante en las micrografías electrónicas de B1, B2 y B3 se encontraron 2/6 PPV's (**Figura 5.24**). Estas 2/6 PPV's son similares en estructura y tamaño (69.5 ± 2.5 nm, $n=10$) a las reportadas por Charpilienne *et al.* (2001).

La presencia de PPV's en las micrografías electrónicas no fue cuantitativa, ya que en este método influyen factores determinantes desde el proceso de preparación de la muestra, hasta el análisis en el microscopio.

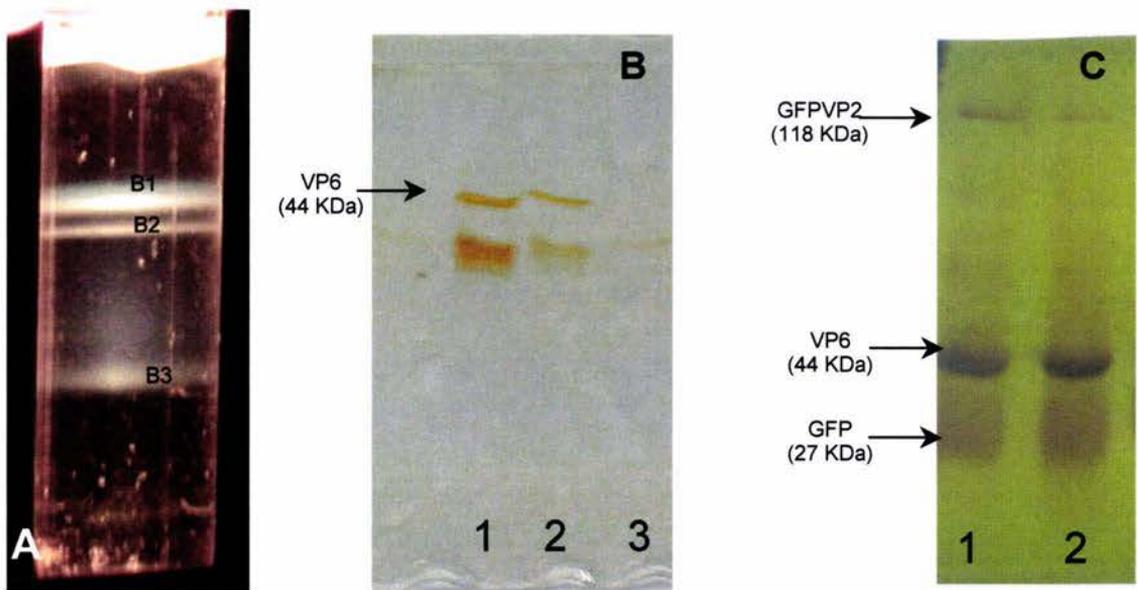


Figura 5.23. Análisis de bandas obtenidas en gradiente de CsCl. **A)** Bandas en el gradiente de cloruro de cesio. **B)** SDS-PAGE al 12%. Línea 1: B1. Línea 2: B2. Línea 3: B3 **C)** Western-blot de SDS-PAGE al 8 %. Línea 1: B1. Línea 2: B2. Anticuerpos primarios (GFP, YM), anticuerpos secundarios (ratón y conejo-peroxidasa).

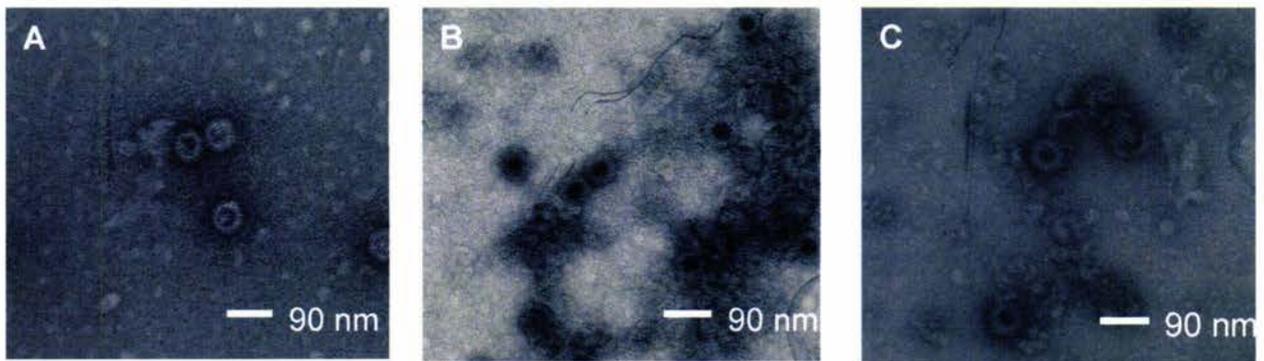


Figura 5.24. Micrografías electrónicas de 2/6 PPV's. **A)** Banda 1. **B)** Banda 2. **C)** Banda 3. Fotografías tomadas en microscopio electrónico (85,000X).

En el interés de desarrollar una metodología cuantitativa y objetiva para la purificación y cuantificación de las PPV's producidas, se implementó la cromatografía líquida de permeación en gel (HPLC-GP) para el análisis de las diferentes bandas obtenidas.

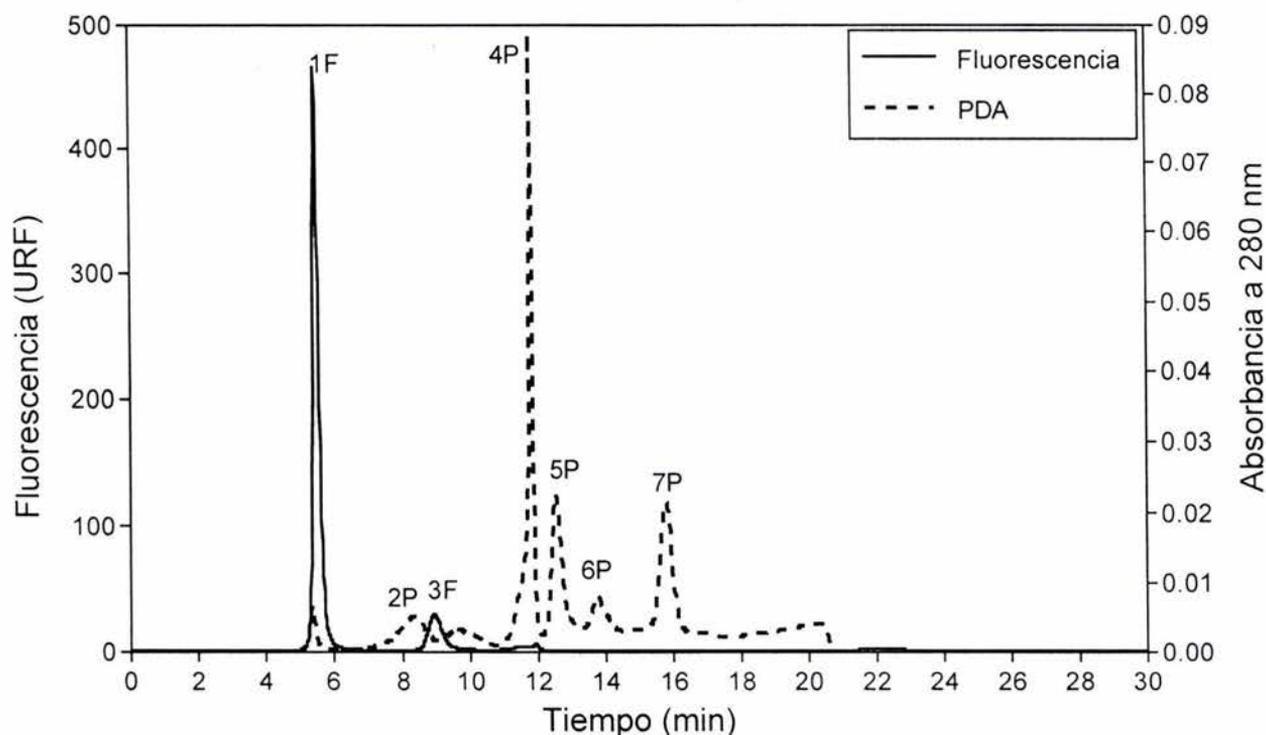


Figura 5.25. Cromatograma de B1 por HPLC-GP. Columna UltraHydrogel 500, detectores de fluorescencia y PDA (Foto arreglo de diodos a 280 nm).

En el cromatograma (**Figura 5.25**) se observa el perfil de fluorescencia y absorbancia de la muestra. Como la 2/6 PPV's tiene en su estructura la GFPVP2 es posible monitorear la fluorescencia a 510 nm, excitando a 484 nm.

Existe un pico a 5.511 min que probablemente corresponde a la 2/6 PPV's. Este tiempo coincide con el tiempo de exclusión de la columna Ultrahydrogel 500. Esta es una columna para muestras acuosas con un tamaño de poro de 50 nm, por lo que la 2/6 PPV (70 nm) y probablemente también la 2 PPV (50 nm) sean excluidas

por su tamaño del resto de las proteínas. El pico a 8.982 min. corresponde al tiempo de migración de la proteína GFP (se corrió un control de GFP inicialmente). Para determinar la composición de los diferentes picos obtenidos, se colectaron estos picos y se analizaron por western blot y microscopía electrónica. (**Figura 5.26**).

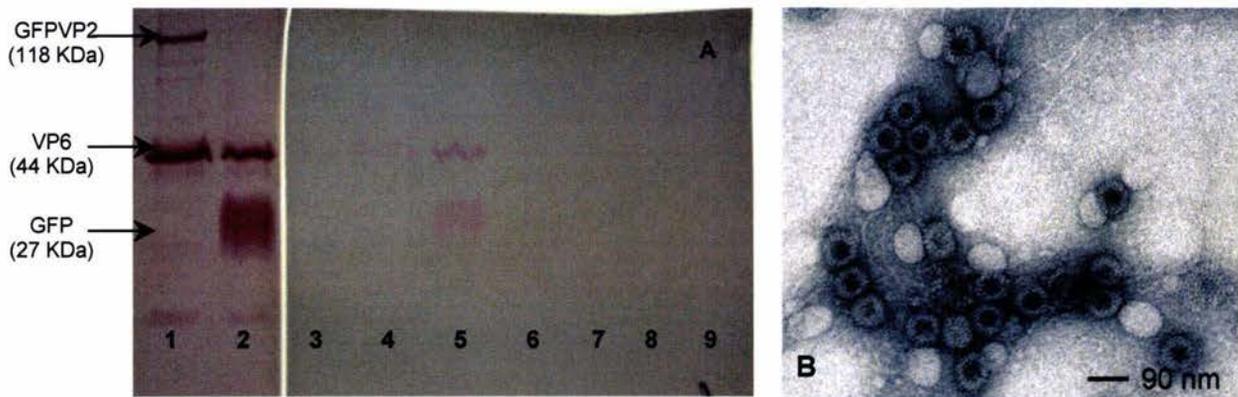


Figura 5.26. Análisis de picos del cromatograma de B1. **A)** Western-blot. Anticuerpos primarios (GFP, YM), anticuerpos secundarios (ratón y conejo-peroxidasa) y revelado con carbazol. Línea 1: pico 1F. Línea 2: pico 3F. Línea 3: nada. Línea 4: Control positivo VP6. Línea 5: pico 2P. Línea 6: pico 4P. Línea 7: pico 5P. Línea 8: pico 6P. Línea 9: pico 7P. **B)** Microscopía electrónica de pico 1F (85,000X).

En la **Figura 5.26.A** y **Figura 5.26.B** se evidencia que el pico 1F corresponde a la 2/6 PPV's debido a que en el western blot se encontraron las dos proteínas y en el análisis por microscopía electrónica se confirma la estructura circular y de aproximadamente 70 nm de las PPV's de rotavirus. El análisis de los demás picos indican que no hay presencia de PPV's (no se observan en el mismo carril las bandas correspondientes a GFPVP2 y VP6). Los picos 2P y 3F solamente contiene la proteína VP6 y GFP, respectivamente. El pico 4P contiene una porción de VP6, pero en los picos 5P, 6P y 7P la concentración de proteína no es detectable por el western blot. Este resultado confirma que mediante la permeación en gel es posible separar las 2/6 PPV's de las proteínas no ensambladas.

Debido a la presencia de 2/6 PPV en las tres bandas del gradiente de CsCl y con el fin de estimar cuál de estas contiene la mayor proporción de PPV's, se analizaron por HPLC-GP las bandas restantes.

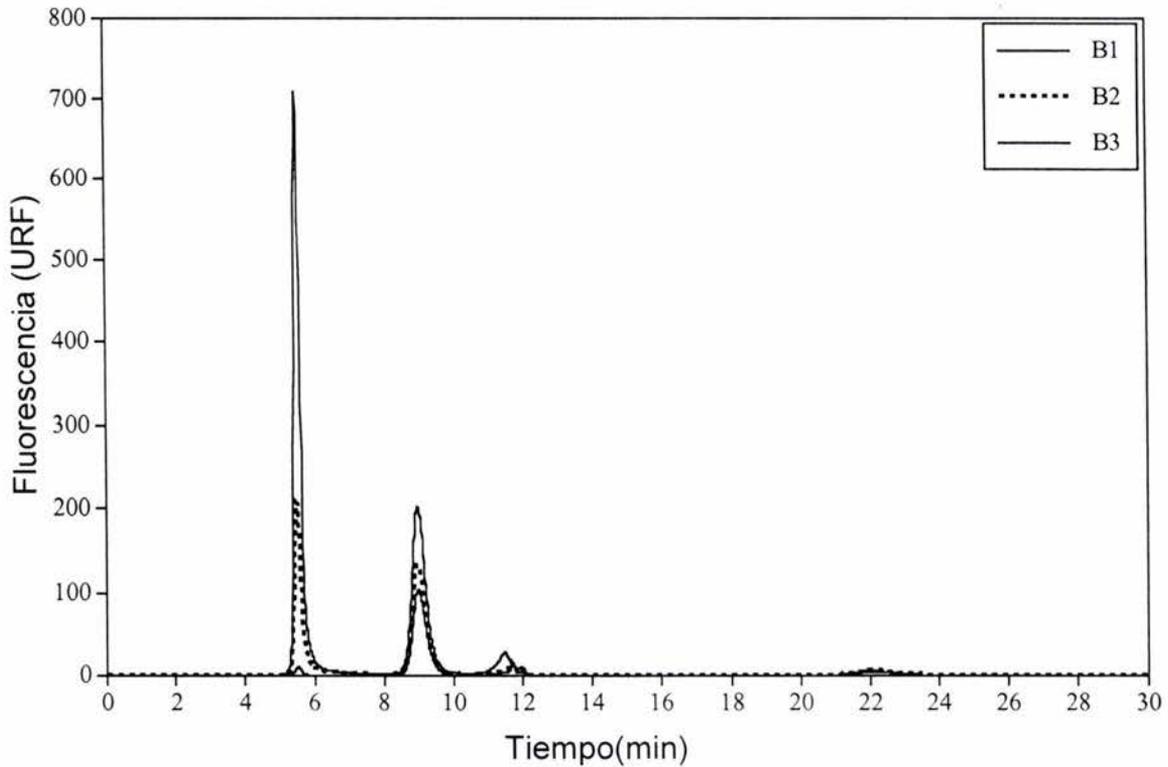


Figura 5.27. Análisis de B1, B2 y B3 por HPLC-GP.

En la **Figura 5.27** se observa el perfil cromatográfico de las diferentes bandas. B1 es la que mayor proporción de 2/6 PPV contiene, mientras que B2 y B3 tienen solo 28% y 2.8 % de 2/6 PPV con respecto a B1, aunque también se presenta una proporción de GFP desacoplada en similar proporción para la 3 bandas.

5.4.2 Cuantificación de PPV's de rotavirus por cromatografía líquida

En la sección anterior se demostró que es posible separar por HPLC-GP las PPV's de las proteínas desensambladas y también la utilidad de la detección por fluorescencia. Utilizando estas ventajas es posible cuantificar la concentración de

PPV's. En la **Figura 5.28** se observa la curva de calibración en HPLC-GP para la proteína GFP.

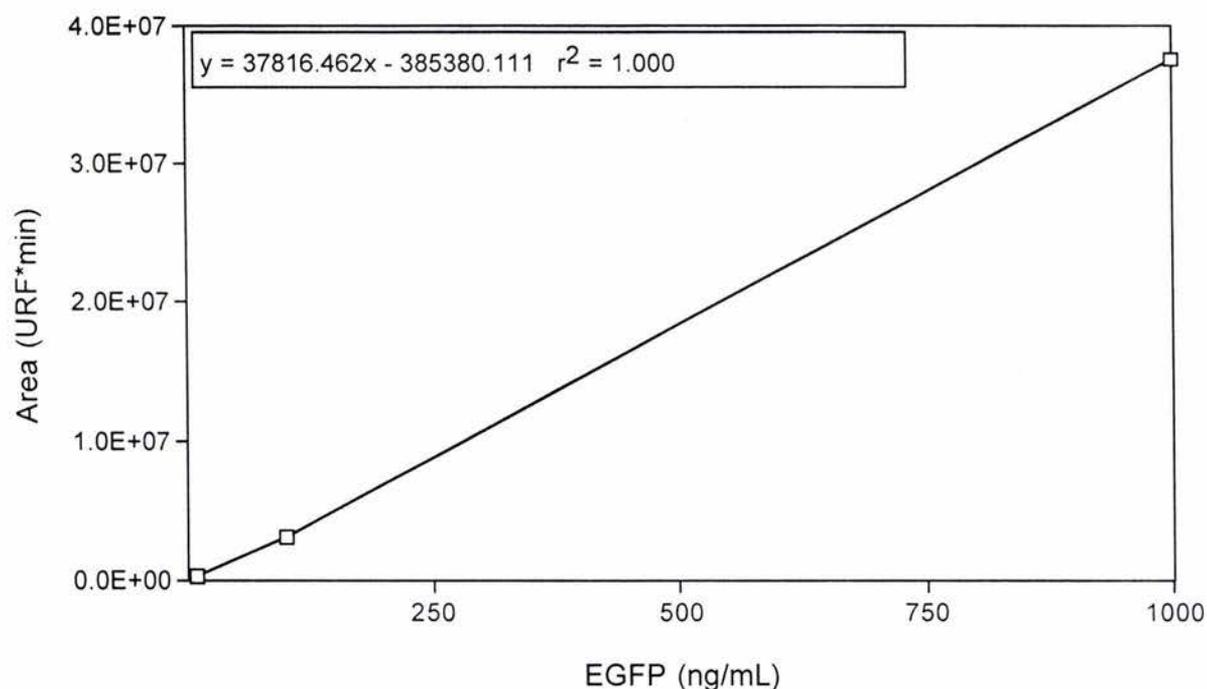


Figura 5.28 . Curva de calibración en HPLC-GP de GFP. Las barras de error son el resultados inyecciones por duplicado. En algunos casos la barra no se observa porque el error es mas pequeño que el símbolo.

Utilizando la cuantificación por HPLC-GP se determinó la proporción de 2/6 PPV's en pellet celular y sobrenadante. Las PPV's presentes en el sobrenadante fueron purificadas por gradiente de CsCl, y las bandas sometidas a HPLC-GP. En la **Figura 5.29** se observa el perfil cromatográfico de las diferentes bandas obtenidas del sobrenadante del cultivo.

Este perfil cromatográfico es de la purificación de 25 mL de cultivo de un total de 200 mL. Haciendo el balance de masa, la proporción de 2/6 PPV's es de 61% en sobrenadante y 39% en el pellet celular. Este dato es muy importante debido a que diferentes autores han reportado que la distribución de la 2/6 PPV's es mayoritaria en el pellet y la purificación por CsCl la hacen con el pellet celular (Sabara *et al.*, 1991; Jiang *et al.*, 1998; Charpilliene *et al.*, 2001). La alta

proporción de 2/6 PPV's en el sobrenadante es consistente, debido a que la proteína externa de la cápside es VP6 y en los resultados de las secciones anteriores se observó que el patrón de localización de VP6 es citoplasmático, además que en las evaluaciones cinéticas más del 80% de la proteína se distribuía en el sobrenadante.

Aunque en otros virus ya se han utilizado las técnicas cromatográficas, este es el primer trabajo donde se desarrolla una técnica cuantitativa para el análisis de PPV's de rotavirus por medio de HPLC-GP.

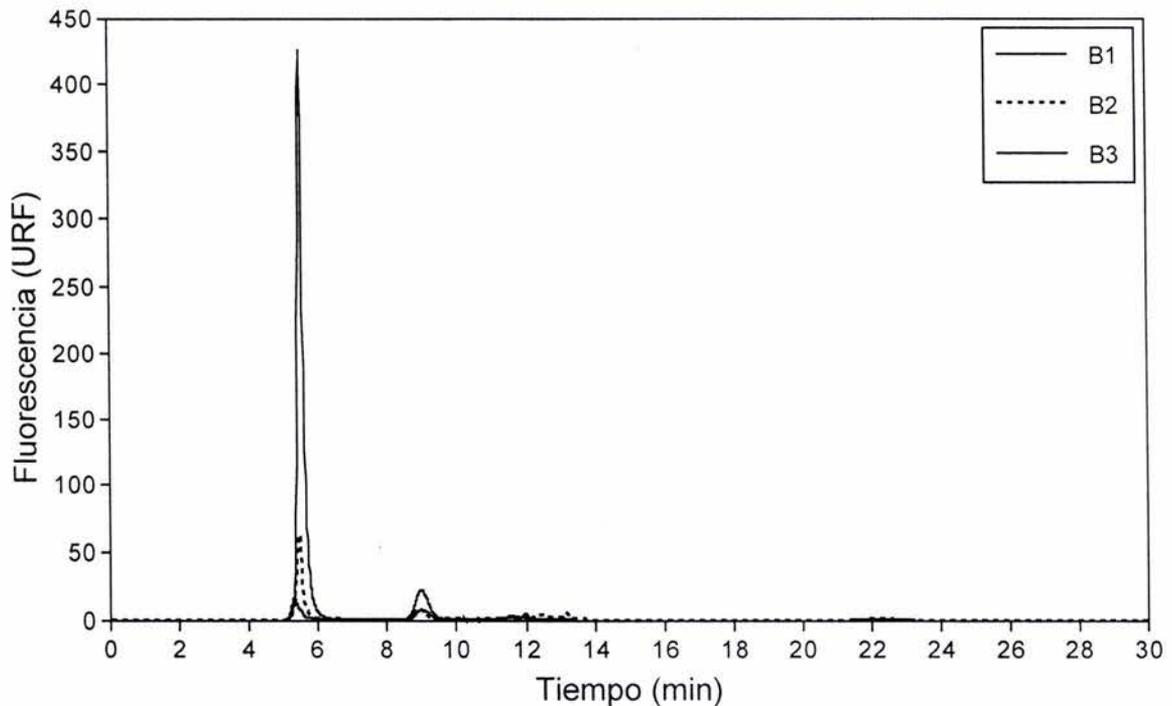


Figura 5.29. Análisis de diferentes bandas obtenidas del sobrenadante celular.

Desde una perspectiva analítica es posible mediante la HPLC-GP monitorear las cinéticas de producción de PPV's, gracias a que el volumen requerido para cuantificar las PPV's será mucho menor que el necesario para el gradiente de CsCl (2 a 5 mL). A partir del sobrenadante solo será necesario hacer una ultrafiltración (300 KDa) para retirar la mayoría de las proteínas celulares y la muestra podrá pasar directamente a la cromatografía. En el análisis del pellet será

necesario hacer ruptura celular, centrifugación y degradación de material genético antes de la ultrafiltración y consecuente paso a la cuantificación por HPLC.

5.4.3. Purificación de PPV's de rotavirus por cromatografía líquida

Las estructuras 2 PPV y 2/6 PPV son cápsides virales concéntricas de 50 nm y 70 nm respectivamente. Su gran tamaño (comparado con las proteínas de la célula), su estructura definida y la inserción de la GFP, hacen factible la purificación de PPV's omitiendo la purificación por gradiente de CsCl.

La columna Ultrahydrogel 500 (tamaño de partícula de exclusión > 50 nm) excluye 2/6 PPV y probablemente también a la 2 PPV. Con el interés de también poder diferenciar entre estas dos estructuras se plantea la siguiente estrategia: Utilizar la columna Ultrahydrogel 500 inicialmente para separar las PPV's del resto de las proteínas. Posteriormente instalar una columna de tamaño de poro mayor (Ultrahydrogel 2000, 200 nm) para separar entre la 2 PPV y 2/6 PPV. En la **Figura 5.30** se observa el perfil cromatográfico de PPV's purificadas (gradiente CsCl) en la configuración de dos columnas en serie (Ultrahydrogel 500 y Ultrahydrogel 2000).

Los tiempos de exclusión aumentaron con respecto a la utilización de una sola columna. En las columnas en serie los tiempos fueron 14.35 min y 19.95 min para 2/6 PPV y GFP, mientras que utilizando solo la columna Ultrahydrogel 500 los tiempos fueron 5.11 min y 8.98 min respectivamente. También aumentó la diferencia de tiempo entre los picos 5.6 min para las columnas en serie, y 3.87 min cuando se utilizó solamente Ultrahydrogel 500. Aún falta analizar la 2 PPV, para verificar si alcanza a entrar en la columna Ultrahydrogel 2000 y poder separarla de la 2/6 PPV.

Teniendo en cuenta que hasta el momento la utilización de la HPLC-GP es analítica (100 µl de muestra) esta metodología puede ser extrapolable y escalable a nivel de cromatografía preparativa.

En conclusión mediante la HPLC-GP es posible analizar, separar y cuantificar las PPV's de forma sencilla, rápida y objetiva.

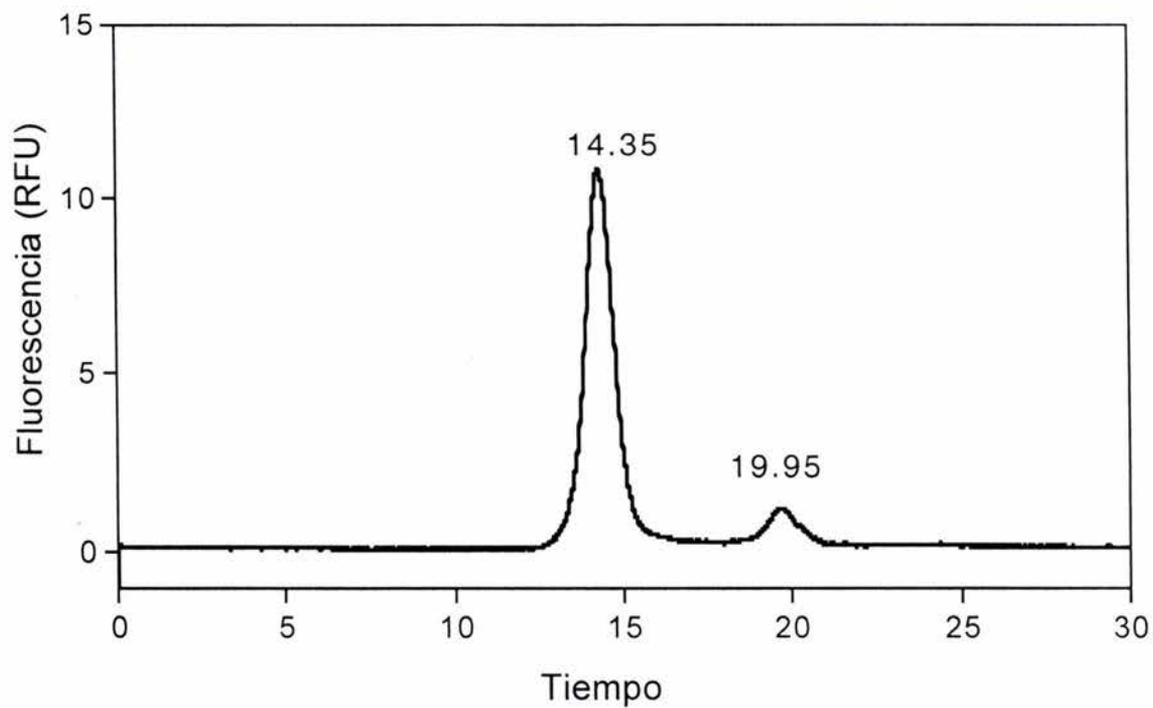


Figura 5.30. Perfil cromatográfico de 2/6 PPV's purificadas por CsCl. Columnas Ultrahydrogel 500 y 2000 en serie.

6. CONCLUSIONES

El método de titulación viral desarrollado es objetivo, rápido y cuantitativo con respecto a los métodos tradicionales (efecto citopático) , además de ser muy útil para titular baculovirus que no contienen genes reporteros.

La proteína VP6, cuando se expresa en células de insecto, se localiza inicialmente difundida en el citoplasma (24 h.p.i.), pero después de las 48 h.p.i. se polimeriza en túbulos no asociados al citoesqueleto, debido a las condiciones ambientales en la célula y probablemente también al aumento de la concentración de proteína.

La proteína GFPVP2 es un excelente quimera que se comporta desde el punto de vista estructural y de localización igual que la proteína nativa VP2. La GFPVP2 expresada en células de insecto se asocia a la membranas preferentemente en un patrón granular, similar al observado con la proteína nativa VP2 .

La coexpresión de las proteínas GFPVP2 y VP6 altera el patrón de localización de ambas proteínas (VP6 y GFPVP2), VP6 pasa de una estructura fibrilar a la formación de gránulos dispersos en la célula. Ambas proteínas colocalizaron en células que las expresan simultáneamente. VP2 ya no sólo se encuentra en la membrana citoplasmática, sino también en gránulos dispersos en la célula.

La velocidad específica de producción de GFPVP2 fue función de la MDI, obteniéndose un máximo a MDI 20 ufp/célula. En cambio, la concentración máxima de GFPVP2 (1129 ± 44 ng/mL) no se alteró por la variación en la MDI.

La MDI en la producción de VP6 tiene una relación inversamente proporcional con la concentración máxima alcanzada. En lo referente a la velocidad específica de producción existe un máximo a MDI 5 ufp/célula, posterior a esta MDI la velocidad específica se mantiene relativamente constante.

La implementación de la cromatografía líquida de permeación en gel (HPLC-GP) demostró ser una herramienta útil, rápida, objetiva y cuantitativa en la separación y cuantificación de PPV's, en comparación con las técnicas tradicionales (gradiente de CsCl). Es el primer trabajo que implementa satisfactoriamente la técnica de HPLC-GP para el análisis y cuantificación de PPV's de rotavirus.

Por medio de este estudio se aclararon aspectos relacionados con la localización celular de las proteínas estructurales y se observó que probablemente la 2/6 PPV se ensambla en el interior de la célula. Este resultado es muy importante desde el punto de vista del desarrollo de estrategias de producción, ya que se deberá optimizar el ensamblaje teniendo en cuenta que una célula deberá estar infectada por lo menos con un baculovirus de cada proteína estructural. Además, mediante la manipulación de la velocidad de síntesis será posible modular la producción de GFPVP2 y VP6.

7. PERSPECTIVAS

Implementar la estrategia de coinfecciones a diferentes relaciones de MDI (MDI bac GFPVP2/MDI bac VP6) para manipular las velocidades de producción de las proteínas y optimizar el ensamblaje y producción de la 2/6 PPV.

Otra perspectiva, pero desde el punto de vista confirmatorio es observar las PPV's dentro de la célula mediante microscopía electrónica, para poder determinar exactamente su localización.

Desde el punto de vista cinético y termodinámico será de interés estudiar el ensamblaje *in vitro* de la 2/6 PPV's. Esto es posible mediante técnicas de anisotropía de fluorescencia, dispersión de luz, etc. De esta forma podremos discernir cuál es el paso limitante en la reacción de ensamblaje y direccionar nuestras estrategias a evitar esta limitación si es que existe.

La cromatografía líquida es una herramienta poderosa en lo que respecta a técnicas analíticas. En el ánimo de seguir utilizando las bondades de la cromatografía líquida es necesario desarrollar ahora técnicas preparativas e industriales para los posteriores procesos de producción.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Agathos S.N. 1996. Insect cell bioreactors. *Cytotechnology*. 20: 173-189.
- Albano C. R., Randers-Eichhorn L., Bentley W.E., Rao G. 1998. Green fluorescent protein as a real time quantitative reporter of heterologous protein production. *Biotechnology Progress*. 14: 351-354
- BD Living Colors User Manual. 2001. PT2040-1 BD Biosciences Clontech. Palo Alto California. pp: 13
- Bertolotti-Ciarlet A., White L., Chen R., Prasa V., Estes M. 2002. Structural requirements for the assembly of Norwalk virus-like particles. *Journal of Virology*. 76 (8): 4044-4055.
- Ciarlet M., Crawford S., Barone C., Bertolotti-Ciarlet A., Ramig R. F., Estes M., Conner M. 1998. Subunit rotavirus vaccine administered parenterally to rabbits induces active protective immunity. *Journal of Virology*. 72 (11): 9223-9246.
- Conner M., Ramig R. 1997. *Viral Enteric Diseases. Viral Pathogenesis*. Lippincott-Raven Publisher. Fields B., Knipe D., Howley P., (Eds). Lippincott-Raven Publisher; Philadelphia. pp 45-62.
- Charpillienne A., Nejmeddine M., Berois M., Perez N., Neumann E., Hewat E., Trugnan G., Cohen, J. 2001. Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 276 (31): 29361-29367.
- Chen X. S., Casini G., Harrison S. C., Garcea R. L. 2001. Papillomavirus capsid protein expression in *E. coli*: Purification and assembly of HPV11 and HPV16 L1. *Journal of Molecular Biology*. 307: 173-182.
- Chen P. L., Wang M., Ou W. C., Lii C. K., Chen L. S., Chang D. 2001a. Disulfide bonds stabilize JC virus capsid-like structure by protecting calcium ions from chelation. *FEBS Letters* 500: 109-113.
- Cheng Y. Lee M., Lai S., Doong S., Wang M. 2001. Separation of pure and immunoreactive virus-like particles using gel filtration chromatography following immobilized metal ion affinity chromatography. *Biotechnology Progress*. 17: 318-325
- Dagget M., Li Q., Weaver R.F., Suprenant K. 1998. Overexpression of the 77-kD echinoderm microtubule-associated protein (EMAP), a WD-40 repeat protein, in baculovirus-infected Sf9 cells. *Cell Motility and the Cytoskeleton*. 41: 57-67.

- DeLisa M., Li J., Rao G., Weigand W., Bentley W.E. 1999. Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of *Escherichia coli* using an on line optical sensor. *Biotechnology and Bioengineering*. 65(1): 54-64.
- Doverskog M., Bertram E., Ljunggren J., Ôhman L., Sennerstam R., Haggstrom L. 2000. Cell cycle progression in serum-free cultures of Sf9 insect cells: Modulation by conditioned medium factors and implications for proliferation and productivity. *Biotechnology Progress*. 16: 837-846.
- Dreschers S., Roncaratti R., Knebel-Morsdorf D. 2001. Actin rearrangement-inducing factor of baculoviruses is tyrosine phosphorylated and colocalizes to F-actin at the plasma membrane. *Journal of Virology*. Vol 75 (8): 3771-3778.
- Endres D., Zlotnick A. 2002. Model-based analysis of assembly kinetics for virus capsids or other spherical polymers. *Biophysical Journal*. 83 (2):1217-1230.
- Estes M. 1996. Rotavirus and their replication. *Fields Virology*. 3 Edition;. Fields B., Knipe D., Howley P., (Eds). Lippincott-Raven Publisher; Philadelphia. pp: 1625-1655
- Estes M., Cohen J. 1989 Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews* 53, 4: 410-449.
- Frapplier T., Liang N., Brown K., Leung C.L. Lynch T., Liem R.K.H., Shelanski M.L. 1999. Abnormal microtubule packing in processes of Sf9 cells expressing the FTDP-17 V337M tau mutation. *FEBS Letters*. 455:262-266.
- Fromantin C., Jamot B., Cohen J., Piroth L., Pothier P., Kohli E. 2001 Rotavirus 2/6 virus-like particles administered intranasally in mice, with or without mucosal adjuvants cholera toxin and *E coli* heat-labile toxin, induce a Th1/Th2-like immune response. *Journal of Virology*. 75 (22): 11010-11016.
- Furtado A., Henry R. 2002. Measurement of green fluorescent protein concentration in single cells by image analysis. *Analytical Biochemistry*. 310 (1): 84-92.
- Gilbert, J. M., Feng, N., Patton, J. T., Greenberg, H. B. 2001. Rotavirus assembly-interaction of surface protein VP7 with middle layer protein VP6. *Arch. Virol*. 146: 1155-1171.
- Goldman C., Petry H., Frye S., Ast O., Ebitsch S., Jenstsch K., Kaup F., Weber F., Trebst C., Nisslein T., Hunsmann G., Weber T., Luke W. 1999. Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JV virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutics studies. *Journal of Virology*. 73 (5): 4465-4469

- Gruenwald S., Heitz J. 1993. Baculovirus expression vector system: Procedures and methods manual. Second Edition. PharMingen. San Diego. California
- Hu Y., Bentley W. 1999. Enhancing yield of infectious bursal disease virus structural proteins in baculovirus expression systems: Focus on media, protease inhibitors, and dissolved oxygen. *Biotechnology Progress*. 15: 1065-1071.
- Hu Y., Bentley W. 2000. A kinetic and statistical-thermodynamic model for baculovirus infection and virus-like particles assembly in suspended insect cells. *Chemical Engineering Science*. 55: 3991-4008.
- Hu Y., Bentley W. 2001. Effect of MOI ratio on the composition and yield of chimeric infectious bursal disease virus-like particles by baculovirus co-infection: deterministic predictions and experimental results. *Biotechnology and Bioengineering*. 75 (1): 104-118.
- Ishizu K., Watanabe H., Han S., Kanesashi S., Hoque M., Yajima H., Kataoka K., Handa H. 2001. Roles of disulfide linkage and calcium ion –mediated interactions in assembly and disassembly of virus-like particles composed of Simian Virus VP1 capsid protein. *Journal of Virology*. 75 (1): 61-72.
- Jiang B., Barniak V., Smith R., Sharma R., Corsaro B., Hu B., Madore p: 1998. Synthesis of rotavirus-like particles in insect cells: comparative and quantitative analysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 60 (3): 369-374.
- Jiang X., Zhong W.M., Farkas T., Huang P.W., Wilton N., Barret E., Fulton D., Morrow R., Matson D.O. 2002. Baculovirus expression and antigenicity characterization of the capsid proteins of three Norwalk-like viruses. *Archives of Virology*. 147: 119-130.
- Kanesashi S., Ishizu K., Kawano M., Tomita S., Watanabe H., Kataoka K., Handa H. 2003. Simian virus 40 VP1 capsid protein forms polymorphic assemblies in vitro. *Journal of General Virology*. Vol 84: 1899-1905.
- Kipikian A., Chanock R. 1996. Rotaviruses. *Fields Virology*. 3 Edition; Fields B., Knipe D., Howley P., (Eds). Lippincott-Raven Publisher; Philadelphia. pp: 1657-1708.
- Kuriyama R., Dragas-Granoic S., Maekawa T., Vassilev A., Khodjakov A., Kobayashi H. 1994. Heterogeneity and microtubule interaction of the CHO1 antigen, a mitosis specific kinesin-like protein. *Journal of Cell Science*. 107: 3485-3499.
- Labbé M., Charpiliene A., Crawford S., Estes M., Cohen J: 1991. Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *Journal of Virology*. 65 (6): 2946-2952.

- Lee C., Ko T., Lee M., Chou C., Lai S., Wang A., Wang M. 2003. Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of immunogenic virus-like particles formed by infectious bursal disease virus (IBDV) structural protein VP2. *Acta Crystallographica*. D59: 1234-1237.
- Lepault J., Petitpas I., Erk I., Navaza J., Bigot D., Dona M., Vachette P., Cohen J., Rey F. 2001. Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *The EMBO journal*. 20 (7): 1489-1507
- Li M., Cripe T. P., Estes P. A., Lyon M.K., Rose R.C., Garcea R. L. 1997. Expression of the human papillomavirus type 11 L1 capsid protein in *E. coli*: Characterization of proteins domains involved in DNA binding and capsid assembly. *Journal of Virology*. 71 (4): 2988-2995.
- Licari P., Bailey J.E. 1991. Factors influencing recombinant protein yields in an insect cell-baculovirus expression system: Multiplicity of infection and intracellular protein degradation. *Biotechnology and Bioengineering*. 37: 238-246.
- Luan Y. T., Mutharasan R., Magee W.E. 1987. Strategies to extend longevity of hybridomas in culture and promote yield of monoclonal antibodies. *Biotechnology Letters*. 9: 691-696.
- Martensen P., Justesen J. 2001. Specific inhibitors prevent proteolytic degradation of recombinant proteins expressed in High Five cells. *BioTechniques*. 30 (4): 782-790.
- Mathieu M., Petitpas I., Navaza J., Lepault J., Kohli E., Pothier P., Prasad B., Cohen J., Rey F. 2001. Atomic structure of the major capsid structure protein rotavirus: implications for the architecture of the virion. *EMBO Journal*. 20 (7) 1485-1497.
- McCarthy M., White W., Palmer-Hill F., Koenig S., Suzich J. 1998. Quantitative disassembly and reassembly of human papillomavirus type 11 viruslike particles in vitro. *Journal of Virology*. 72: 32-41
- Medina M., Lopez -Rivas A., Zuidema D., Belsham G.J. Domingo E., Vlak J.M. 1995. Strong buffering capacity of insect cells. Implications for the baculovirus expression system. *Cytotechnology*. 17: 21-26.
- Mena J.A., Ramírez O.T., Palomares L.A. 2003. Titration of Non-Occluded Baculovirus Using a Cell Viability Assay. *BioTechniques*. 34: 260-264.
- Miller W. 1996. *Insect viruses. Fields Virology*. 3 Edition; Lippincott-Raven Publisher; Philadelphia.
- Newcomb W., Homa F., Thomsen D., Zhiping Y., Brown J. 1994. Cell-free assembly of the herpes simplex virus capsid. *Journal of Virology*. 68 (9): 6059-6063.

- Newcomb W., Homa F., Thomsen D., Booy F., Trus B., Steve A., Spencer J., Brown J. 1996. Assembly of herpes simplex virus capsid: Characterization of intermediates observed during cell free capsid formation. *Journal of Molecular Biology*. 263: 432-446.
- O'Neal C., Crawford S., Estes M., Conner M. 1997. Rotavirus like-particles administered mucosally induce protective immunity. *Journal of Virology*. 71 (11): 8707-8717.
- O'Keefe D., Paiva A. 1995. Assay for recombinant Hepatitis B surface antigen using reversed-phase high performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry*. 230: 48-54.
- O'Really D., Miller L., Luckow V. A. 1994. *Baculovirus expression vector: a laboratory manual*. Ed. Oxford University Press. New York. pp 27-30.
- Ortega A. 2003. Efecto del tiempo de infección y de la multiplicidad de infección sobre la expresión de una proteína modelo expresada en dos líneas celulares de insecto: High Five y Sf9 en cultivos en suspensión. Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Palkova Z., Adamec T., Liebl D., Stoková J., Forstová J. 2000. Production of polyomavirus structural protein VP1 in yeast cells and its interactions with cell structures. *FEBS Letters*. 478: 281-289.
- Palomares L.A., Ramirez O.T. 1996. The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cells culture. *Cytotechnology*. 22: 225-237.
- Palomares L.A., 1999. Estudio del proceso de producción y ensamblaje de proteínas multiméricas a través del sistema células de insecto-baculovirus. Tesis de Dr. en Ciencias; Universidad Nacional Autónoma de México.
- Palomares L.A., López S., Ramírez O. 2002. Strategies for manipulating the relative concentration of recombinant rotavirus structural proteins during simultaneous production by insect cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 78 (6): 635-644.
- Palomares L.A., Estrada-Mondaca S., Ramirez O.T. Principles and applications of the insect cell baculovirus expression vector system. En: *Cell culture technology for pharmaceutical and cellular therapies*. Ozturk S., Hu W.S. (Eds). Marcel-Dekker, New York. En prensa.
- Patton J. T., Spencert E. 2000. Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology*. 277: 217-225.

- Power J. F., Reid S., Radford K. M., Greenfield P. F., Nielsen L. K. 1994. Modeling and optimization of the baculovirus expression vector system in a batch suspension culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 44 (6): 710-719.
- Prasad B. V. V., Wang, G. J., Clerx, J. P. M., Chiu, W. 1988. Three-dimensional structure of rotavirus. *J. Mol. Biol.* 199: 269-275.
- Radford K., Reid S., Greenfield P. 1997. Substrate limitation in the baculovirus expression vector system. *Biotechnology and Bioengineering*. 56 (1): 32-44.
- Ramirez O.T., Mutharasan R. 1990. Cell cycle and growth phase dependent variations in size distribution, antibody productivity and oxygen demand in hybridoma cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 36: 839-848.
- Randers-Eichhorn L., Albano C. R., Sipior J., Bentley W.E., Rao G. 1997. On-line green fluorescent protein sensor with LED excitation. *Biotechnology and Bioengineering*. 55 : 921-926.
- Rhiel M., Mitchell-Logean C.M., Murhammer D. W. 1997. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High Five) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 55: 909-920.
- Roncaratti R., Knebel-Morsdorf D. 1997. Identification of the early actin rearrangement-inducing factor gene, *arif-1*, from *Autographa californica* multicapsid nuclear polyhedrosis virus. *Journal of Virology*. 71 (10): 7933-7941.
- Rose R., Bonnez W., Reicman R., Garcea R. 1993. Expression of human papillomavirus type 11 L1 protein in insect cells: *in vivo* and *in vitro* assembly of viruslike particles. *Journal of Virology*. 67 (4): 1936-1944.
- Roy P., Mikhailov M., Bishop D. H. L. 1997. Baculovirus multigene expressions vectors and their use for understanding the assembly process of architecturally complex virus particles. *Gene*. 190: 119-129.
- Rueda P., Fominaya J., Langeveld J. P. M., Brusckke C., Vela C., Casal J.I. 2001. Effect of different baculovirus inactivation procedures on the integrity and immunogenicity of porcine parvovirus-like particles. *Vaccine*. 19: 726-734.
- Ruiz M. C., Charpilienne A., Liprandi F., Gajardo R., Michelangeli F., Cohen J. 1996. The concentration of Ca²⁺ that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *Journal of Virology*. 70 (8): 4877-4883.
- Sabara M., Parker M., Aha P., Cosco C., Gibbons E., Parsons S., Babiuk L. 1991. Assembly of double-shelled rotavirus-like particles by simultaneous expression of recombinant VP6 and VP7 proteins. *Journal of Virology*. 65 (12): 6994-6997.

- Schleager E.J. 1996. Medium design for insect cell culture. *Cytotechnology*. 20: 57-70.
- Shabram P., Giroux D., Goudreau A., Gregory R.J., Horn M., Huyghe B., Liu X., Nunnally M., Sugarman B., Sutjipto S. 1997. Analytical anion-exchange HPLC of recombinant type-5 adenoviral particles. *Human Gene Therapy*. 8: 453-465.
- Sharp D., Kuriyama R., Essner R., Bass P. 1997. Expression of a minus-end-directed motor protein induces Sf9 cells to form axon-like processes with uniform microtubule polarity orientation. *Journal of Cell Science*. 110: 2373-2380.
- Smith G. E., Summers M.D., Frase M. J. 1983. Production of human beta interferon in insect cells with a baculovirus expression vector. *Molecular and Cellular Biology*. 3: 2156-2165.
- Takehara K., Ireland D., Bishop D. H. L. 1988. Co-expression of the hepatitis B surface and core antigens using baculovirus multiple expression vectors. *Journal of General Virology*. 69: 2763-2777.
- Thomas H., Carman W. F. 2000. Hepatitis B vaccine. United States Patent. No. 6,099,840.
- Tleugabulova D., Falcón V., Sewer M., Penton E. 1998. Aggregation of recombinant hepatitis B surface antigen in *Pichia pastoris*. *Journal of Chromatography A*. 716: 209-219.
- Tleugabulova D., Falcón V., Penton E. 1999. Physico-chemical characterization of recombinant hepatitis B surface antigen by multidimensional approach. *Journal of Chromatography A*. 845: 171-179.
- Tsao E., Mason M., Cacciuttolo M., Bowen S.; 1996. Production of parvovirus B19 vaccine in insect cells co-infected with double baculovirus. *Biotechnology and Bioengineering*. 49:130-138.
- Wong K.T.K., Peter C. H., Greenfield P. F., Reid S., Nielsen L.K. 1996. Low multiplicity infection of insect cells with recombinant baculovirus: The cell yield concept. *Biotechnology and Bioengineering*. 49: 659-666.
- Yang F., Moss L., Phillips G. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein. <http://www-bioc.rice.edu/Bioch/Phillips/Ppapers/gfpbio.html>.
- Yuan Y., Shane E., Oliver C. 1998. Reversed-phase high performance liquid chromatography of virus-like particle. *Journal of Chromatography A*. 816: 21-28.

- Zeng, C. Q., Estes, M. K., Charpilienne, A., Cohen, J. 1998. The N-terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. *Journal of Virology*. 72 (1): 201-208.
- Zhang W., Carmichael J., Ferguson J., Inglis S., Ashrafian H., Stanley M. 1998. Expression of human papillomavirus type 16 L1 protein in *E. coli*: Denaturation, renaturation, and self assembly of virus-like particles *in vitro*. *Virology*. 243: 423-431.
- Zlotnick A. 1994. To build a capsid. An equilibrium model of the self assembly of polyhedral protein complexes. *Journal of Molecular Biology*. 241: 59-67.
- Zlotnick A. Aldrich R., Johnson J., Ceres P., Young M. 2000. Mechanism of capsid assembly for an icosahedral plant virus. *Virology*. 277: 450-456.
- Zlotnick A., Stray S. 2003. How does your virus grow? Understanding and interfering with virus assembly. *TRENDS in Biotechnology*. 21 (12): 536-542.