



Instituto de Biotecnología

**Universidad Nacional Autónoma de
México**

**Estudio de la producción de vectores de virus
adeno-asociado tipo 2 en el sistema de células de
insecto- baculovirus.**

T e s i s

Que para obtener del grado de Maestra en Ciencias

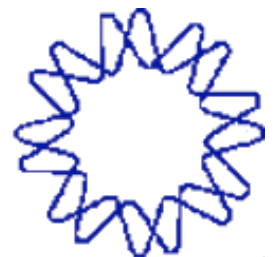
P r e s e n t a :

IBQ. Lili Esmeralda Gallo Ramírez

T u t o r a :

Dra. Laura A. Palomares Aguilera

Cuernavaca, Morelos 2007





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.

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría de la Dra. Laura A. Palomares Aguilera en el laboratorio del Dr. Tonatiuh Ramírez Reivich. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo económico de la beca CONACyT 194605, y de los proyectos PAPIIT-UNAM IN223805 y SEP-CONACyT 46225-Z.

Agradecimientos

A la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera por su dirección, apoyo, paciencia y confianza durante toda la realización de este trabajo.

Al Dr. Tonatiuh Ramírez Reivich por permitirme incorporarme a su grupo de investigación y por sus acertadas observaciones y sugerencias.

A los miembros de mi comité tutorial, por sus consejos para la realización de este trabajo:

Dra. Susana Castro Obregón.

Dr. Ramón González García Conde.

A los miembros del jurado, por sus observaciones para mejorar este escrito:

Dra. Brenda Valderrama.

Dra. Martha Argüello Morales.

Dra. Vera Petricevich.

Dr. Leobardo Serrano Carreón.

A las MC. Vanessa Hernández y Ruth Pastor por su apoyo técnico, así como a Karin Levy por su apoyo administrativo.

A la unidad de docencia por su apoyo administrativo: Ing. Jalil Saab, Maribel Velasco y Gloria Villa.

A Indira Muñoz por su apoyo durante su estancia dentro del programa “Verano de la Investigación Científica” de la Academia Mexicana de Ciencias.

A mis compañeros de laboratorio que hicieron más agradable mi estancia y que me apoyaron con su experiencia: Germán, Eliane, Yimmy, Julio C., Antonino, Mauricio, Toño, William, Caspeta, Modesto, Marco T., Álvaro y Ricardo.

Dedicatoria

A mi familia, que me ha apoyado incondicionalmente en todos los proyectos que he emprendido, los amo:

A ti Mamá: que siempre me has empujado a buscar más. Que has sido ejemplo de tenacidad y fortaleza. Que siempre has estado ahí, y que me recibes con la más bella sonrisa al volver a casa.

A ti Papalote: que me has apoyado siempre y que has sido ejemplo de trabajo y dedicación.

A Irasema: que siempre has sido generosa conmigo y que me has enseñado el significado de lealtad y de familia. Me encanta que estemos más juntas que nunca.

A Ely: por ser mi primer maestra y despertarme en la infancia la pasión por el conocimiento, y por ser una gran compañera de juegos.

A Irais: por tu frescura, entusiasmo y tenacidad, que han sido un motor para mí. Sé que podrás alcanzar todo lo que te propongas.

A Chuy: hermanito, por lo mucho que compartimos de niños, ya de adulto aún sigo descubriéndote.

A mis grandes amigas: Arianna, Liz, Kika, Jessy, Marthita, Patsy y Karla. Las quiero mucho, mil gracias por su apoyo en todo momento y las porras que he recibido de ustedes desde niñas. Aún en la distancia su cariño me ha ayudado a seguir adelante.

A mi grupo de amigos: Ciro, Ana, Gloria, Toño, Roberto, Cony, Lupita, que se han convertido en mi familia en Cuernavaca.

A las muchachas: Lila, Minu, Julia Elena y Olga Z., por compartir de corazón las alegrías y las tristezas de la familia. Y por ser las porristas oficiales de los hijos de la Rosy.

ÍNDICE

ÍNDICE

Índice de Figuras	iii
Índice de Tablas	v
Abreviaturas y Simbología	vi
RESUMEN	vii
ANTECEDENTES	1
Terapia Génica y Vectores Virales	1
Virus Adeno-Asociado	1
<i>Genoma</i>	2
<i>Proteínas estructurales</i>	3
<i>Proteínas no estructurales</i>	4
Producción de vVAA	6
<i>Sistema de Células de Insecto Baculovirus (SCI-BV)</i>	7
<i>Baculovirus</i>	7
<i>Efecto de la Multiplicidad de Infección (MDI)</i>	9
<i>Producción de vVAA mediante el Sistema de Células de Insecto Baculovirus (SCI-BV)</i>	11
OBJETIVOS	14
Objetivo General	14
Objetivos Específicos	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
Líneas celulares	15
Baculovirus recombinantes	15
Cultivos celulares y cinéticas de producción de proteínas	17
Ensayo en placa para el aislamiento de placas virales	17
<i>Producción de stocks virales a partir de placas aisladas</i>	18
Determinación de títulos virales	18
Análisis de expresión de proteínas	19
<i>Cuantificación de proteína en microplaca por el método de Bradford</i>	19
<i>Expresión de proteína verde fluorescente (GFP)</i>	20
<i>Expresión de proteínas</i>	20
<i>Anticuerpos monoclonales</i>	21
<i>Preparación de curvas estándar para proteínas VP</i>	21
<i>Análisis densitométrico de películas de Western blot</i>	22
Purificación de cápsides de VAA por ultra-centrifugación	23
Cuantificación de cápsides de VAA empleando cromatografía de exclusión en gel	23
<i>Determinación del tamaño de partícula</i>	24
<i>Cálculo de rendimientos de partículas ensambladas</i>	24
<i>Cuantificación de ADN residual</i>	25
Microscopía electrónica de transmisión de partículas virales con tinción negativa	25
Estudio de producción de proteínas Rep y vVAA utilizando diferentes stocks de BacRep	26

Evaluación de la capacidad transductora de los vVAA	26
Extracción de ADN de baculovirus	27
Amplificación de ADN viral	27
Construcción de baculovirus recombinantes	28
<i>Digestión con enzimas de restricción</i>	29
<i>Ligación de ADN</i>	29
<i>Transformación de células competentes</i>	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
Obtención de un estándar de VAA-2	31
<i>Purificación de cápsides de VAA por ultra-centrifugación</i>	31
<i>Preparación de curvas estándar para cuantificación de proteínas VP</i>	33
Microscopía electrónica de transmisión de partículas de VAA	36
Cinética de producción de proteínas estructurales y cápsides de VAA-2	38
<i>Parámetros cinéticos de los cultivos infectados</i>	38
<i>Proteína total</i>	40
<i>Análisis de proteínas estructurales de VAA-2</i>	42
<i>Producción de VP3</i>	44
<i>Producción de VP2</i>	46
<i>Producción de VP1</i>	47
<i>Relación estequiométrica de proteínas VP</i>	48
Cuantificación de cápsides de VAA-2	49
<i>HPLC de exclusión en gel</i>	50
<i>Determinación de tamaño de partícula</i>	51
<i>Efecto del ADN en los patrones de absorbancia en HPLC</i>	54
Rendimientos de ensamblaje de proteína VP	55
Estudio de producción de proteínas Rep y vVAA utilizando diferentes stocks de BacRep	58
<i>Expresión de proteínas Rep a partir de stocks de BacRep de diferente número de pase</i>	58
<i>Producción de vVAA utilizando stocks de BacRep de diferente número de pase</i>	60
Amplificación de stocks y cálculo de título viral	62
<i>Expresión de GFP</i>	63
<i>Expresión de proteínas VP</i>	64
<i>Expresión de proteínas Rep</i>	65
Construcción de nuevos baculovirus para la expresión de Rep52 y Rep78	67
Diseño de oligos para amplificación de ADN viral	68
<i>Oligos para amplificación de genes Rep78 y Rep52</i>	68
<i>Oligos para amplificación del gen de GFP</i>	69
Amplificación de ADN viral	70
CONCLUSIONES	72
PERSPECTIVAS	75
BIBLIOGRAFÍA	76

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Reconstrucción de la estructura de la cápside de virus adeno- asociado tipo 2.	2
Figura 2.	Mapa transcripcional del genoma de VAA.	3
Figura 3.	Diagrama del ciclo de replicación de baculovirus silvestre.	8
Figura 4.	Probabilidad de que una población sea infectada por al menos un baculovirus calculada utilizando la distribución de Poisson.	10
Figura 5.	Construcciones realizadas por Urabe (2002) para producir los baculovirus BacRep (a), BacCap (b) y BacGFP (c).	16
Figura 6.	Curvas de calibración para la determinación de radios hidrodinámicos.	24
Figura 7.	Diseño de oligos para amplificación de los casetes de expresión de Rep78 y Rep52 a partir del plásmido pFDLSR.	29
Figura 8.	Bandas obtenidas por gradientes de CsCl a partir de muestras de pellet (a) y sobrenadante (b).	32
Figura 9.	Gel teñido con Coomassie de SDS-PAGE de muestras purificadas por ultracentrifugación usando gradientes de CsCl.	32
Figura 10.	Western blot de curva de cuantificación de proteína VP usando los anticuerpos B1 (a) y A69 (b).	34
Figura 11.	Curvas estándar para VP3 (a), VP2 (b) y VP1 (c) obtenidas con el anticuerpo B1.	36
Figura 12.	Partículas detectadas por microscopía electrónica usando tinción negativa.	37
Figura 13.	Evolución de la concentración celular (a), del porcentaje de viabilidad (b) y de la concentración celular viable (c) en cultivos infectados con BacCap y en cultivo control.	39
Figura 14.	Concentración de proteína total (a), proteína en pellet (b) y proteína en sobrenadante (c) en cultivos infectados con BacCap y en cultivo control.	41
Figura 15.	Western blot de proteínas VP de VAA-2 en muestras de pellet utilizando los anticuerpos B1(a) y A69 (b).	43
Figura 16.	Producción total de proteínas VP3 (a), VP2 (b) y VP1 (c).	45
Figura 17.	Relación estequiométrica de VP's a la concentración máxima total de VP3.	48
Figura 18.	Perfil cromatográfico de cápsides vacías de VAA.	51
Figura 19.	Perfil cromatográfico de absorbancia de muestras de extracto de pellet de cultivos no infectados, cultivos infectados con BacCap a diferentes MDI, y de partículas purificadas del AsHB.	52

Figura 20.	Perfil cromatográfico de fluorescencia de muestras de extracto de pellet de cultivos no infectados, cultivos infectados con BacCap a diferentes MDI, y de partículas purificadas del AsHB.	52
Figura 21.	Western blot con anticuerpo B1 de fracciones recolectadas por HPLC de exclusión en gel a partir de extractos de pellet de cultivos infectados con BacCap a diferentes MDI.	53
Figura 22.	Comparación de perfiles cromatográficos de ADN digerido, ADN sin digerir; muestra de extracto de pellet ,y muestra de extracto de pellet a la cual se añadió ADN digerido.	55
Figura 23.	Rendimientos de ensamblaje de proteína VP con respecto a la proteína VP acumulada en pellet.	56
Figura 24.	Relación estequiométrica de proteína VP en muestras provenientes de pellet.	56
Figura 25.	Cápsides/mL producidas en cultivos infectados con BacCap.	57
Figura 26.	Western blot de muestras de extracto de pellet en infecciones individuales con stocks de BacRep de diferente número de pase.	59
Figura 27.	Western blot de extractos de pellet en coinfecciones con BacGFP (P3), BacCap (P3) y BacRep de diferente número de pase.	59
Figura 28.	Expresión de Rep52 y producción de partículas transductoras de vVAA a partir de coinfecciones con BacFGP (P3) y BacCap (P3), utilizando stocks de BacRep de diferente número de pase.	61
Figura 29.	Células Sf9 infectadas con BacGFP observadas en microscopio de epifluorescencia.	64
Figura 30.	Western blot para detectar expresión de proteínas VP en placas de BacCap usando el anticuerpo B1.	65
Figura 31.	Western blot para detección de proteínas Rep con el anticuerpo monoclonal 259.5.	66
Figura 32.	Productos de amplificación a partir del plásmido pFBDLR.	68
Figura 33.	Productos de PCR de amplificaciones a partir de ADN viral.	71

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Baculovirus recombinantes.	15
Tabla 2.	Anticuerpos monoclonales murinos contra proteínas y partículas de VAA-2.	21
Tabla 3.	Programa para ciclos de reacción de PCR.	28
Tabla 4.	Reactivos para reacción de PCR.	28
Tabla 5.	Reactivos para reacción de digestión con enzimas de restricción.	29
Tabla 6.	Ecuaciones obtenidas a partir de inmunoblot con el anticuerpo B1.	35
Tabla 7.	Ecuaciones obtenidas a partir de inmunoblot con el anticuerpo A69.	35
Tabla 8.	Rendimiento de proteína total (μg de Proteína total / cél).	42
Tabla 9.	Títulos virales obtenidos usando el método desarrollado por Mena et al. (2003)	62
Tabla 10.	Análisis de expresión de GFP en diferentes placas virales.	63
Tabla 11.	Oligos diseñados para amplificar el casete de expresión de Rep78 y Rep52 a partir de pFBDSLRS.	67
Tabla 12.	Oligos para amplificación de secuencias de proteínas Rep.	69
Tabla 13.	Oligos para amplificación de GFP y p35 por PCR cuantitativo.	70
Tabla 14.	Productos de PCR a partir de ADN purificado de baculovirus.	70

ABREVIATURAS Y SIMBOLOGÍA

AcMNPV	Nucleopoliedrovirus de Multicápside de <i>Autographa californica</i>
AsHB	Antígeno de superficie de Hepatitis B
CPI	Concentración de proteína inyectada
DO	Unidades de densidad óptica
F#	Fracción #
FBS	Suero fetal bovino
FI	Fracción de interés
FP	<i>Few polyhedra mutants</i>
GFP	Proteína verde fluorescente
hpi	Horas post infección
ITR	Terminaciones invertidas repetidas
MDI	Multiplicidad de infección
NI	No infectado
p#	Placa #
P#	Pase #
PE	Proteína ensamblada
PM	Peso molecular
PPV	Pseudo-partícula viral
PT	Partículas transductoras
RH	Radio hidrodinámico
RBS	Sitio de unión a proteínas Rep
SCI-BV	Sistema de células de insecto-baculovirus
t	Tiempo
TDI	Tiempo de infección
TOD	Tensión de oxígeno disuelto
TRS	Sitio terminal de resolución
UD	Unidades densitométricas
UFP	Unidades formadoras de placa
URF	Unidades relativas de fluorescencia
VAA	Virus adeno-asociado
VD	Virus defectuosos
VP iny	Proteína VP inyectada
vVAA	Vector de virus adeno-asociado
Xv	Concentración celular viable
δ	Densidad

RESUMEN

Virus adeno-asociado (VAA) se utiliza como vector en estudios clínicos para el tratamiento de enfermedades, ya sean de origen genético o no, mediante terapia génica. Tradicionalmente los vectores de virus adeno-asociado (vVAA) se han producido en células humanas, sin embargo, esto implica algunos inconvenientes que dificultan la producción a gran escala o comprometen la inocuidad del producto obtenido. Urabe et al. (2002) describieron por primera vez la producción de vVAA en el sistema de células de insecto baculovirus (SCI-BV) usando 3 baculovirus recombinantes: BacCap, que expresa las proteínas de la cápside (VP1, VP2 y VP3) de VAA-2; BacRep, que expresa las proteínas no estructurales Rep78 y Rep52; y BacGFP, que sirve para amplificar los genomas recombinantes del vVAA. Sólo cuando las células son infectadas por los 3 baculovirus y se expresan todos los componentes es posible obtener partículas transductoras (PT) de vVAA. Algunos estudios se han enfocado en incrementar los rendimientos de PT de vVAA mediante la manipulación de la MDI de estos 3 baculovirus. Sin embargo no reportan cinéticas ni rendimientos de producción de los elementos involucrados en la generación de vVAA, información que permitiría conocer cómo afecta la relación estequiométrica entre proteínas VP, proteínas Rep y genomas de vVAA a los rendimientos obtenidos en el SCI-BV. En este trabajo se buscó generar información que ayudara a comprender los factores que afectan la producción de vVAA en el SCI-BV a fin de desarrollar estrategias para mejorar los rendimientos de PT.

En este estudio se obtuvieron las primeras cinéticas de producción de proteína VP. En ellas se evaluó el efecto de la MDI de BacCap sobre la viabilidad y la concentración celular de cultivos de células High Five™, sobre los rendimientos de producción de cada proteína VP, sobre la estequiometría de producción entre proteínas VP y sobre su eficiencia de ensamblaje. Para obtener tal información se implementaron estrategias para cuantificar proteína VP desensamblada y ensamblada, tales como densitometría de películas de Western Blot y HPLC de exclusión en gel, respectivamente, cuyas implicaciones metodológicas se discuten aquí. Los mejores rendimientos de cápsides (6×10^{11} cápsides/mL) y proteína VP se alcanzaron a la MDI de 0.1 UFP/cél (99.3 ± 8.8 µg/mL de VP3, 26.1 ± 3.0 µg/mL de VP2 y 34.0 ± 1.1 µg/mL de VP1). La mejor eficiencia de ensamblaje de proteína VP en pellet (11.5%) se obtuvo a MDI de 10 UFP/cél. Se realizó además un estudio de la expresión de Rep52 en stocks de BacRep de diferente número de pase en infecciones individuales, y coinfecciones con BacCap y BacGFP, donde se observó que BacRep es inestable y que la expresión de Rep52 influye en los rendimientos de PT de vVAA. Finalmente, se presentan estrategias para la construcción de baculovirus que expresen individualmente Rep78 y Rep52 a fin de estabilizar la expresión de estas proteínas, condición necesaria para el posterior desarrollo de cinéticas de producción de proteínas Rep, así como para estudios de replicación y empaquetamiento de genomas de vVAA en el SCI-BV. Este trabajo es el primero en proporcionar información sobre la producción de proteína VP y su ensamblaje, misma que podría resultar útil para la producción de cápsides de VAA con aplicación distinta a la producción de vectores, tal como la bionanotecnología. Se presentan además las bases para el estudio cinético de otros elementos que conforman al vVAA, tales como los genomas recombinantes, en el SCI-BV.

ANTECEDENTES

Terapia Génica y Vectores Virales

La terapia génica se está empleando para combatir una gran variedad de padecimientos, sean de origen genético o no. Se ha utilizado en tratamientos contra distrofia muscular, fibrosis cística, hemofilia B, algunos tipos de cáncer y mal de Parkinson entre otros padecimientos, así como en estudios sobre regeneración de retina (Lai et al., 2002; Grimm y Kay, 2003; Gonçalves 2005). Este tipo de terapia involucra la introducción de material genético a células de tejidos específicos con el fin de corregir una anomalía mediante la expresión de algún gen terapéutico, para lo cual es necesario el empleo de vectores (Kay et al., 1997). Los vectores son vehículos que permiten la entrega de material genético al interior de la célula.

En terapia humana los vectores de virus adeno-asociado (vVAA) se han convertido en vehículos muy prometedores por diversas razones: 1) a diferencia de otros vectores los vVAA son capaces de transducir células que han dejado de dividirse, permitiendo el tratamiento de células neuronales, musculares y del ojo; 2) generan una baja o nula respuesta inmune por lo que resultan vehículos ideales para terapia humana, y son especialmente útiles en el tratamiento de órganos sensibles a inflamación como el cerebro; 3) permiten la expresión prolongada del gen terapéutico reduciendo así la necesidad de readministrar dosis frecuentes del vector, e incluso la integración sitio-específica de genes en el cromosoma 19 en humanos; y 4) los diferentes serotipos de vVAA permiten la transducción específica de una gran variedad de órganos y tejidos (Kay et al., 1997; Duan et al., 1998; Monahan y Samulski, 2000; Daly 2002; Grimm y Kay, 2003; Gonçalves, 2005; Wang et al., 2005).

Para generar vVAA, se reemplazan los genes del genoma del virus con el gen que se desea entregar durante la terapia génica. Sólo se conservan las secuencias del genoma viral necesarias para la replicación y encapsidación del ADN. Puesto que los genes que codifican para los componentes virales son eliminados, el vVAA es incapaz de generar otras partículas virales en el hospedero.

Virus Adeno-Asociado

Los virus adeno-asociados pertenecen a la familia *Parvoviridae* y al género *Dependovirus*. Tienen como hospederos a animales vertebrados, sin embargo no se ha observado ningún efecto

patógeno de estos virus sobre sus hospederos. Los VAA dependen de la coinfección con adenovirus o herpesvirus (un virus auxiliar) para llevar a cabo su ciclo de replicación (Berns, 1990; Berns 1996), por lo que se les ha denominado virus defectuosos. De los serotipos identificados en primates es el del tipo 2 (VAA-2), aislado de humanos, el más ampliamente caracterizado y el que ha servido como modelo en estudios sobre replicación del virus silvestre y de producción de vectores para terapia génica.

El VAA-2 (figura 1) es un virus desnudo de 20–25 nm de diámetro. La cápside está conformada por 60 subunidades proteicas dispuestas en un arreglo de simetría icosaédrica (Xie et al., 2002). Estas subunidades son las proteínas VP1, VP2 y VP3, las cuales se encuentran presente en una relación estequiométrica aproximada de 1:1:10 (Rose et al., 1971).

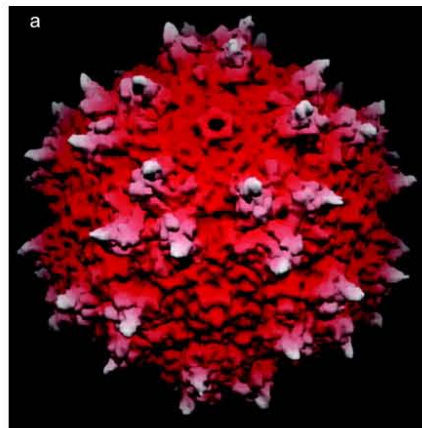


Figura 1. Reconstrucción de la estructura de la cápside de virus adeno-asociado tipo 2 (tomado de Xie et al., 2002).

Las partículas de VAA presentan una relativa resistencia a calor y a algunos detergentes y solventes además de ser estables en un amplio rango de pH (3-9), por lo que su estructura es más estable durante los procesos de purificación en comparación con otros virus empleados también como vectores (Lai et al., 2002).

Genoma

El genoma de VAA-2 es de ADN lineal de cadena sencilla, de 4.68 Kb de longitud flanqueado por terminaciones invertidas repetidas (ITR) y contiene dos marcos de lectura abiertos (ORF). Un ORF contiene los genes *cap* que codifican para las proteínas de la cápside bajo el promotor *p40* y, el otro contiene los genes *rep* que codifican para las proteínas no estructurales bajo los promotores *p5* y *p19*. Los transcritos son procesados por medio de *splicings* y los ORF se

definen por codones de inicio distintos (figura 2). Las ITR están constituidas por los 145 nucleótidos terminales del genoma; estos son palíndromes auto-complementarios que forman un dúplex intramolecular en forma de T que actúa como *primer* durante la replicación. Por este motivo, las ITR son esenciales para la replicación del ADN de cadena sencilla del virión en ADN de doble cadena para la posterior transcripción del genoma viral (Berns, 1996; McCarty et al., 2004). Dentro de estas secuencias terminales están incluidos además un sitio de unión a proteínas Rep (RBS), que consiste en varias repeticiones del tetranucleótido 5'GAGC3' (Chiorini et al., 1995); y un sitio terminal de resolución (TRS), que es una secuencia sensible a la actividad endonucleasa de proteínas Rep. Estos sitios resultan indispensables para llevar a cabo la replicación y encapsidación del genoma viral (Ward et al., 1994; Burgess et al., 2004; McCarty et al., 2004). Por tanto, las ITR son las únicas secuencias del genoma viral que se requieren en *cis* para la replicación y el empaquetamiento del ADN durante la producción de vVAA.

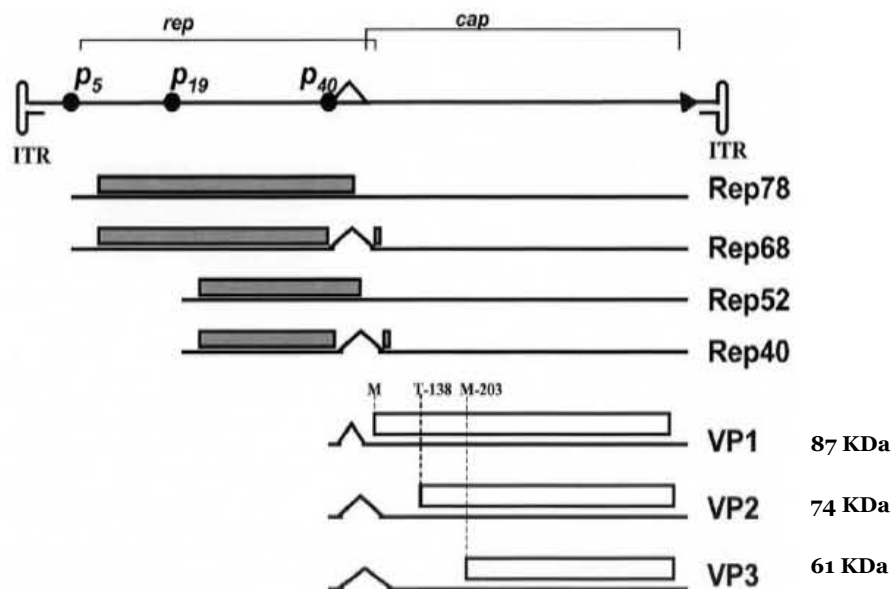


Figura 2. Mapa transcripcional del genoma de VAA-2 (tomado de Timpe et al., 2005).

Proteínas estructurales

Las proteínas que conforman la cápside de VAA-2 son: VP1 de 87 KDa, VP2 de 74 KDa y VP3 de 61 KDa (Rose et al., 1971; Berns, 1996). Éstas son proteínas no glicosiladas (Murray et al., 2006) que difieren entre sí en su extremo amino-terminal. Todas se expresan bajo el promotor *p40* a partir del cual se producen 2 transcritos de diferente peso molecular, uno de 2.6 Kb y otro de 2.3 Kb. VP1 se expresa a partir del mensajero de 2.6 Kb, VP2 y VP3 se traducen a partir del mensajero de 2.3 Kb utilizando codones de inicio distintos (figura 2). Se ha observado que el

transcrito de menor peso molecular constituye cerca del 50% del RNAm de VAA-2 en células infectadas en presencia de adenovirus, mientras que el de 2.6 Kb se encuentra en cantidades mucho menores (Trempe y Carter, 1988). El codón de inicio de VP2 es un codón ACG que provoca que los niveles de expresión de esta proteína sean menores a los de VP3. Por tanto, la expresión de las proteínas VP de VAA-2 está regulada tanto a nivel transcripcional como traduccional propiciando que VP1, VP2 y VP3 se expresen en una relación similar a aquélla en la cual se ensamblan (Trempe y Carter, 1988).

Estas proteínas se sintetizan en el citoplasma de la célula y son transportadas hacia el interior del núcleo. El ensamblaje de cápsides parece ser dependiente de la concentración de proteínas VP (Redemann et al., 1989; Wistuba et al., 1997). Sin embargo, durante las primeras etapas de infección de VAA silvestre no se observa ensamblaje de partículas en el citoplasma a pesar de la alta concentración de proteínas VP, pero sí en el nucleolo. En etapas posteriores de infección se empieza a detectar la presencia de cápsides virales en el resto del núcleo. Este hecho sugiere que el ensamblaje de partículas de VAA se lleva cabo en el nucleolo y que posteriormente las partículas se acumulan en el núcleo de la célula (Wistuba et al., 1997).

Con el fin de determinar el papel estructural de las proteínas VP se han producido pseudo-partículas virales de VAA-2 en células de mamífero y de insecto que contienen sólo una o dos de las proteínas estructurales (Ruffing et al., 1992; Wistuba et al., 1997; Hoque et al., 1999; Warrington et al., 2004). Se ha reportado que la ausencia de VP1 provoca una reducción en la capacidad transductora de las partículas (Girod et al., 2002), mientras que la ausencia de VP3 impide la encapsidación de los genomas virales (Warrington et al., 2004). Utilizando el sistema de células de insecto baculovirus se han producido partículas de VAA-2 con capacidad transductora similar a la del virus silvestre (Urabe et al., 2002); de igual forma, se ha implementado este sistema para la producción de vectores de VAA de otros serotipos para uso en terapia génica (Kohlbrenner et al., 2005; Urabe et al., 2006).

Proteínas no estructurales

Las proteínas no estructurales, si bien no forman parte de la cápside viral, son componentes necesarios en el ciclo de replicación del virus. Estas proteínas son Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40, en referencia a su peso molecular aparente. Rep78 y Rep68 se expresan bajo el promotor *p5* y difieren entre sí en su extremo carboxilo terminal debido a un *splicing* en el transcrito. Rep52 y Rep40 se expresan bajo el promotor *p19* y difieren entre sí de la misma forma que las Rep de mayor peso molecular (figura 2). Todas las proteínas Rep poseen actividad helicasa

dependiente de ATP y secuencias de unión a ADN, sólo las 2 de mayor peso molecular presentan actividad endonucleasa en un dominio de su extremo amino terminal.

Durante una etapa muy temprana de infección de VAA silvestre, en la cual no existe síntesis de proteínas VP, las proteínas no estructurales se sintetizan en el citoplasma de la célula y son transportadas al interior del núcleo donde ocurre la replicación del ADN viral. Se ha detectado que en etapas más avanzadas de infección, las proteínas Rep y VP colocalizan en el núcleo, donde se han detectado complejos de cápsides virales con Rep78 y Rep52 principalmente, así como complejos de proteínas Rep con el ADN viral (Hunter y Samulski, 1992; Wistuba et al., 1995; Wistuba et al., 1997; Dubielzig et al., 1999).

Al inicio del proceso de replicación del genoma viral, la ITR forma un dúplex intramolecular en forma de T que sirve como *primer* para la replicación a partir del extremo 3' y la formación de ADN de doble cadena. Esta hebra de ADN dúplex posee un extremo ligado covalentemente. Las proteínas Rep78 y Rep68 se unen al RBS de la ITR ligada covalentemente y realizan un corte en el TRS. Se ha observado que Rep78 permanece unida covalentemente al extremo 5' del sitio de corte. En síntesis, la función primaria de Rep78 y Rep68 es resolver el extremo de la ITR cerrado covalentemente para obtener 2 hebras de ADN que sirvan de templado en un posterior ciclo de replicación. Una vez que el ADN ha sido replicado se empaqueta en las cápsides virales previamente ensambladas a partir del extremo 3'. En este proceso, las Rep de alto peso molecular son responsables de la interacción entre la cápside y el ADN, pero son Rep52 y Rep40 quienes inducen la encapsidación de los genomas virales. Se ha observado que el dominio con actividad helicasa de estas proteínas es esencial para el proceso de encapsidación, por lo que se ha propuesto que Rep52 y Rep40 desenrollan la doble cadena de ADN al mismo tiempo que la introducen en la cápside (Smith y Kotin, 1998; King et al., 2001).

Rep78 y Rep68 se han identificado como componentes indispensables en el proceso de replicación del genoma viral tanto *in vivo* como *in vitro* (Ni et al., 1994; Ward et al., 1994), y la expresión de sólo una de ellas, en co-expresión con los demás elementos de VAA, puede generar partículas infectivas de VAA (Hölscher et al., 1995). La replicación puede llevarse a cabo en ausencia de Rep52 y Rep40, sin embargo, se ha observado que el empaquetamiento de genomas sólo se lleva a cabo en presencia de las Rep de menor peso molecular (King et al., 2001). En células de insecto se han replicado y empaquetado genomas recombinantes de VAA-2 en presencia de sólo Rep78 y Rep52 (Urabe et al., 2002).

Producción de vVAA

Para producir vVAA de uso en terapia génica es necesario sintetizar: 1) las proteínas que conforman la cápside viral y lograr su ensamblaje, 2) el ADN que se desea entregar durante la terapia, y 3) las proteínas necesarias para la replicación y encapsidación de este ADN.

Los vVAA se han producido tradicionalmente en células de mamífero dependientes de anclaje utilizando las líneas HEK293 y HeLa, derivadas de riñón de embrión humano y tejido cervical cancerígeno, respectivamente. En este sistema, tanto los genes *rep* y *cap* como el genoma recombinante son introducidos a la célula por medio de plásmidos independientes. El empleo de virus auxiliares, potencialmente patógenos para el hombre, se ha eliminado a través del uso de plásmidos con genes de adenovirus o herpesvirus, o de líneas celulares modificadas que expresan estos genes endógenamente. Sin embargo, la producción de vVAA en células de mamífero posee ciertas limitantes tales como: 1) la necesidad de generar y mantener líneas celulares estables y libres de agentes potencialmente patógenos para el humano; 2) los mecanismos mismos de transfección, los cuales son más eficientes en soporte sólido que en suspensión, lo que dificulta el escalamiento del proceso; y 3) la necesidad de utilizar medios complejos y enriquecidos con suero, lo que incrementa los costos de producción.

Recientemente se han desarrollado estrategias para producir vVAA mediante el sistema de células de insecto-baculovirus (SCI-BV), en el que las partículas producidas poseen características indistinguibles de aquéllas producidas en células de mamífero (Urabe et al., 2002; Kohlbrenner et al., 2005; Urabe et al., 2006). Los elementos necesarios para la producción de vVAA son introducidos a las células de insecto mediante la infección con baculovirus recombinantes que contienen las secuencias necesarias para la expresión de estos elementos.

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

estudiar la producción de vectores virales empleando distintas relaciones estequiométricas entre los componentes (O'Reilly et al., 1994; Palomares et al., 2006).

En el SCI-BV se han obtenido cerca de 10^{12} partículas transductoras (PT) de vVAA-2 por L de cultivo (Meghrous et al., 2005; Aucoin et al., 2006). Actualmente algunas empresas exploran la producción de proteína recombinante utilizando el SCI-BV a una escala de 20000 L; por lo que el SCI-BV hará más factible satisfacer los requerimientos de las dosis empleadas en pruebas clínicas, las cuales pueden llegar al orden de 10^{12} PT/Kg de peso del paciente (Gonçalves, 2005).

Sistema Células de Insecto-Baculovirus (SCI-BV)

El SCI-VB es usado ampliamente para producir proteínas recombinantes de interés comercial, vectores y pseudo-partículas virales. Este sistema consiste en un vector viral (un baculovirus recombinante) que infecta células de insecto, y utiliza la maquinaria celular para replicarse y expresar el producto recombinante. Los genes recombinantes contenidos en el vector se encuentran generalmente bajo promotores que inducen altos niveles de expresión tales como el *polh* o el *p10*. Entre las líneas celulares más utilizadas se encuentran la Sf9 de *Spodoptera frugiperda* y la Tn5B1-4 de *Trichoplusia ni* (conocida comercialmente como High Five™). Se ha reportado que la producción de PT de vVAA-2 es mayor en células High Five™ que en Sf9, obteniéndose 4.38×10^2 PT /cél y 1.58×10^2 PT /cél, respectivamente (Meghrous et al., 2005).

Baculovirus

Baculovirus es un virus de 250-300 nm de longitud y 30-60 nm de diámetro. Pertenece a la familia *Baculoviridae*, cuyos miembros se caracterizan por ser patógenos sólo para artrópodos. La mayoría tienen como hospederos a insectos lepidópteros (mariposas y polillas), aunque también se han aislado de dípteros (mosquitos), himenópteros (avispas) y crustáceos. El genoma viral es ADN circular de doble cadena empacado en una cápside en forma de barra, que en el caso de los virus no ocluidos está envuelta por una membrana externa que es adquirida al salir de la célula infectada. Una característica de baculovirus es la formación de cápsulas proteicas llamadas cuerpos de oclusión compuestas por la proteína poliedrina (O'Reilly et al., 1994; Miller, 1996).

El baculovirus AcMNPV (Nucleopoliedrovirus de Multicápside de *Autographa californica*) es el más estudiado, además de ser ampliamente utilizado en el SCI-BV por ser capaz de infectar cerca de 30 líneas celulares (Palomares et al., 2006). Su genoma, de 131 Kpb, contiene al

promotor *polh* que regula la expresión del gen que codifica para la poliedrina. En general, se producen baculovirus recombinantes sustituyendo el gen de poliedrina o el gen *p10* por el de la proteína de interés (Beljelarskaya, 2002); de esta manera es posible obtener rendimientos de hasta 50% de proteína recombinante con respecto a la proteína total Palomares y Ramírez, 2001; Palomares et al., 2006).

El ciclo de replicación de baculovirus está dividido en 4 etapas (figura 3). Durante la fase temprana inmediata (0-4 hpi), los viriones migran hacia el núcleo celular donde el ADN viral es liberado de la cápside. En esta fase se inicia la expresión de genes tempranos que codifican para enzimas involucradas en la replicación de ADN y para activadores transcripcionales involucrados en la expresión de genes tardíos. La fase temprana (4-7 hpi) se caracteriza por rearrreglos en el citoesqueleto y núcleo celular, así como por la degradación del ADN de la célula hospedero. Durante esta fase el gen *p35* expresa un inhibidor apoptótico para evitar el suicidio celular. En la fase tardía (7-20 hpi) se lleva a cabo la replicación del ADN viral y se expresan los genes que codifican para las proteínas estructurales. Durante esta etapa se producen los virus no ocluidos (carecen de poliedrina) que son liberados para infectar otras células. Durante la fase muy tardía (18-120 hpi) se expresan los genes *polh* y *p10*; por tanto, en un sistema recombinante que utiliza estos promotores, ésta es la etapa en la que se genera el producto de interés (O' Reilly et al., 1994; Blissard, 1996; Miller, 1996; Pál-Hajós, 2000; Beljelarskaya, 2002; Palomares et al., 2006).

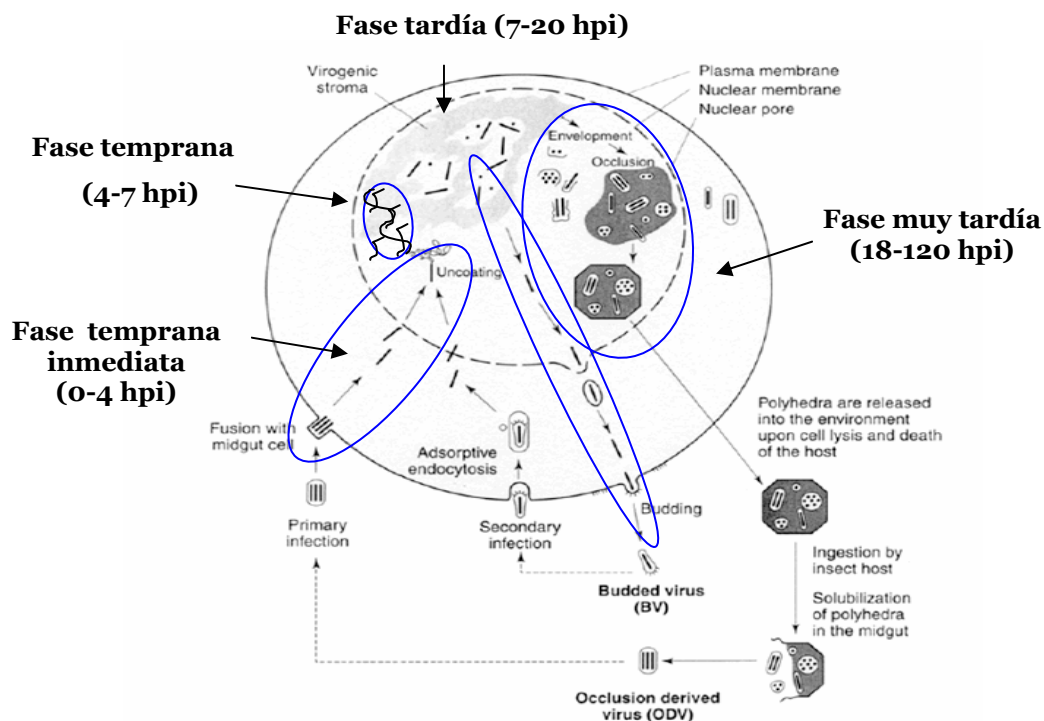


Figura 3. Diagrama del ciclo de replicación de baculovirus silvestre (tomado de Pál-Hajós, 2000).

El ciclo de replicación de un baculovirus recombinante es idéntico al del baculovirus silvestre, y difieren sólo en que en el primero no se generan cuerpos de oclusión en la fase muy tardía debido a que el gen de poliedrina ha sido sustituido por el gen de interés.

Efecto de la Multiplicidad de Infección (MDI)

Un sistema óptimo de producción de vVAA sería aquel en el cual se obtenga un máximo en la concentración de vectores con capacidad transductora, mientras que la acumulación de proteína no ensamblada y de partículas no transductoras sea mínima. Para esto es necesario que todos los elementos que conforman al vVAA se encuentren en una relación estequiométrica adecuada, misma que aún no ha sido determinada. Una variable a considerar para la optimización de un sistema de producción en cultivos de células de insecto es la concentración de oxígeno disuelto. Palomares y Ramírez (1996) reportaron que para la línea Sf9 las velocidades de crecimiento y de consumo de nutrientes, así como la concentración no se ven afectadas a tensiones de oxígeno disuelto (TOD) por arriba de 10%. Al parecer, la producción de proteína recombinante es muy sensible a la TOD pudiendo haber cambios en los rendimientos de producción así como en el patrón de glicosilación de las proteínas (Palomares et al., 2006). Otras variables importantes que deben considerarse en este tipo de cultivos son la multiplicidad de infección (MDI) y el tiempo de infección (TDI).

La MDI se define como el número de unidades formadoras de placa (UFP) por célula con las que un cultivo es infectado, mientras que el TDI se refiere a la concentración celular y está relacionado con la edad del cultivo. La fracción de la población que potencialmente será infectada por el virus está determinada por la MDI (infección primaria), debido a que la probabilidad de que una célula tenga un contacto exitoso con un virus es mayor cuanto mayor sea la MDI empleada. El proceso de infección comprende una serie de eventos que inicia cuando un virus entra en contacto con una célula. Este evento es meramente aleatorio y dependerá directamente del número de partículas infectivas por célula (MDI). Después se lleva a cabo la entrada del virión a la célula y la expresión de genes tempranos del virus. Las células que no son infectadas durante la infección primaria continúan creciendo y replicándose, posteriormente estas células pueden ser infectadas (infecciones secundaria) por la progenie viral liberada de las células infectadas en la infección primaria. Se ha reportado que al infectar con un solo tipo de baculovirus, y utilizar MDI y TDI bajos se alcanzan concentraciones celulares y niveles de producción de pseudo-partículas virales (PPV) más altos que los obtenidos con MDI mayores (Licari y Bailey 1991; Maranga et al., 2003). Se ha observado que la infección a TDI altos

produce bajos rendimientos de proteína recombinante independientemente de la MDI empleada (Ortega-García, 2003), este efecto está relacionado con el agotamiento de nutrientes y la acumulación de desechos en el medio de cultivo.

La distribución de Poisson expresa la probabilidad de un número de eventos independientes entre sí ocurriendo en un tiempo fijo, si se conoce la tasa media con que ocurren estos eventos. Resulta factible utilizar la distribución de Poisson para predecir la probabilidad de que una célula sea infectada a una MDI dada puesto que la infección de una célula es un evento independiente de la infección de otras células, además de que es posible medir la tasa de infección en un tiempo determinado. Utilizando la distribución de Poisson la probabilidad de que una célula sea infectada a una MDI determinada está dada por:

$$P_{(n)} = \frac{MDI^n e^{-MDI}}{n!} \quad (\text{Ecuación 1})$$

$P_{(n)}$ representa la probabilidad de que una célula sea infectada por n partículas infecciosas. Este análisis probabilístico predice que con una MDI de 5 UFP/célula, el 98% de las células estarán infectadas por al menos 1 partícula infecciosa (figura 4) (Palomares et al., 2002). Esto sugiere que para la producción de vVAA, donde se requiere la infección con más de un baculovirus recombinante, son recomendables MDI mayores a 5 UFP/célula, de cada baculovirus, para aumentar la probabilidad de que los diferentes baculovirus recombinantes coinfecten la misma célula. De esta forma todos los elementos que conforman el vector estarían disponibles en cada célula, lo que resultaría en mayores rendimientos de partículas transductoras.

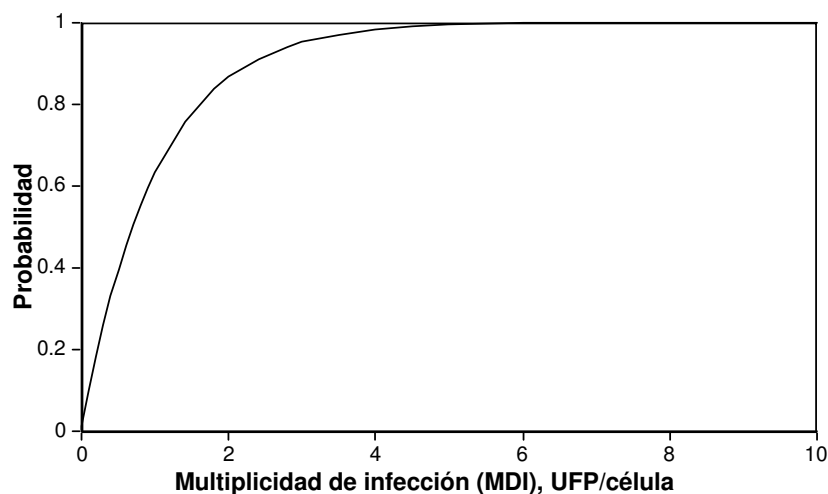


Figura 4. Probabilidad de que una población sea infectada por al menos un baculovirus calculada utilizando la distribución de Poisson.

Se ha observado que el efecto de la MDI sobre la producción de proteínas recombinantes de rotavirus en infecciones individuales es igual al que se observa para cada una de ellas en coinfecciones con más de un baculovirus distinto, por lo que la información derivada de cultivos que producen 1 tipo de proteína puede utilizarse para predecir su comportamiento durante las coinfecciones (Palomares et al., 2002).

En un sistema más complejo, como el de la producción de vectores virales donde es necesario producir la cápside viral, el ADN del virus y además las proteínas Rep para lograr su encapsidación, resultaría de suma importancia la información derivada de la producción individual de cada componente viral para desarrollar estrategias de coinfección que conlleven a la obtención de mejores rendimientos con la menor carga metabólica innecesaria para la célula. En la producción de vVAA-2, la integración del ADN a las cápsides proteicas parece ser una limitante que se refleja en bajos rendimientos de partículas con capacidad transductora en relación a la producción total de partículas virales (Meghrous et al., 2005; Aucoin et al., 2006), por lo que un análisis de la producción de genomas virales y proteínas Rep parece ser necesario para mejorar los rendimientos. El estudiar el efecto de la MDI en la producción de proteína VP y su ensamblaje en cápsides de VAA puede además tener aplicación en la producción de partículas biológicas para uso en bionanotecnología.

Producción de vVAA-2 mediante el Sistema Células de Insecto-Baculovirus

Recientemente se reportó por primera vez la producción de vectores de virus adeno-asociado tipo 2 en el sistema de células de insecto-baculovirus utilizando 3 baculovirus recombinantes derivados de AcMNVP denominados BacCap, BacRep y BacGFP (Urabe et al., 2002). Dicho sistema, mismo que se utiliza en este estudio no precisa de la expresión de genes de algún virus auxiliar. Utilizando este sistema de expresión se han producido hasta 10^{12} vVAA con capacidad transductora por litro (Meghrous et al., 2005; Aucoin et al., 2006). Sin embargo, el porcentaje de partículas transductoras representa menos del 0.1% de la producción total de cápsides virales. Este hecho sugiere que podría existir una limitante en la replicación y/o encapsidación del genoma viral recombinante.

BacCap contiene el gen que codifica para las 3 proteínas estructurales de VAA-2 bajo el control transcripcional del promotor de poliedrina (*polh*). Cuando se utilizó por primera vez este baculovirus se reportó que las partículas producidas poseían una relación estequiométrica prácticamente igual a la del virus silvestre (Urabe et al., 2002); sin embargo, reportes

posteriores han coincidido en que la relación estequiométrica de las partículas es distinta a la del virus silvestre (Kolhbrenner et al., 2005; Meghrouis et al., 2005).

BacRep contiene los genes que expresan las proteínas Rep78 y Rep52 de VAA-2. La expresión de Rep78 se encuentra bajo el control de un promotor *IE-1* modificado ($\Delta IE-1$) que se activa durante la fase temprana de infección, mientras que Rep52 se expresa bajo el promotor tardío *polh*. La modificación realizada al promotor *IE-1* por Urabe et al. (2002) tiene como objetivo obtener bajos niveles de expresión de Rep78. Al parecer se requiere una baja expresión de esta proteína debido a su capacidad de inducir apoptosis en células de mamífero (Schmidt et al., 2000), sin embargo se desconoce si es capaz de producir el mismo efecto en células de insecto.

BacGFP alberga al gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), flanqueado por las ITR de VAA-2, y se utiliza para amplificar el genoma recombinante. La proteína GFP se encuentra bajo el control del promotor de citomegalovirus (*CMV*) para su expresión en células de mamífero y del promotor tardío *p10* para su expresión en células de insecto. Esta construcción permite cuantificar el número de partículas de vVAA con capacidad transductora mediante fluorescencia durante la transducción de células de mamífero.

Utilizando este sistema de expresión la producción de vVAA podría darse bajo el siguiente esquema: la producción inicia con la expresión de Rep78 durante la fase temprana de infección (4-7 hpi). Durante la fase tardía (7-20 hpi) se lleva a cabo la replicación de ADN del baculovirus y con ello la amplificación de los genomas recombinantes que en presencia de Rep78 pueden ser escindidos del genoma del baculovirus para replicarse de forma independiente. Tanto las proteínas VP, como la proteína Rep52, empiezan a expresarse durante la fase muy tardía (18-120 hpi); en esta fase se encuentran presentes todos elementos necesarios para la formación de partículas transductoras. Las proteínas VP son transportadas al núcleo de la célula donde empiezan a ensamblarse en el para formar cápsides vacías; Rep78 forma complejos con la proteína VP ensamblada y el genoma recombinante, el cual es introducido en las cápsides por acción de Rep52 con lo que se inicia la acumulación de genomas recombinantes de cadena sencilla. En esta misma fase se inicia la expresión de GFP que es el gen contenido en el genoma recombinante de VAA. Por tanto la expresión de GFP en células de insecto durante coinfecciones con los baculovirus descritos puede ser utilizada como un indicador práctico del momento en que inicia la síntesis de vVAA completos.

La información que existe sobre la producción de vVAA, tanto en células de mamífero como de insecto, se encuentra enfocada a la optimización de los rendimientos de partículas transductoras estudiando el proceso de forma general y sin prestar atención a lo que sucede durante las diferentes etapas involucradas en el proceso. Actualmente se desconoce cuál es el elemento que limita la producción de partículas transductoras y cuáles son los factores que lo afectan. Por lo que en este proyecto se propuso inicialmente obtener información sobre la producción de cada elemento que necesario para la producción de vVAA en el SCI-BV, y el efecto de la concentración de estos elementos en etapas específicas tales como la replicación y el empaquetamiento del ADN viral.

Es de destacar que parte de la información obtenida mediante este estudio no ha sido reportada antes, por lo que contribuirá al desarrollo de estrategias racionales de producción de vectores virales mediante el SCI-BV.

OBJETIVOS

Objetivo General

Obtener las bases para lograr incrementar la producción de partículas con capacidad transductora de virus adeno-asociado tipo 2 en el SCI-BV utilizando los baculovirus BacCap, BacRep y BacGFP.

Objetivos Específicos

- ❑ Estandarizar técnicas de cuantificación de proteínas VP de VAA-2.
- ❑ Desarrollar un método de cuantificación de cápsides de VAA-2.
- ❑ Determinar parámetros cinéticos de producción de proteínas estructurales de VAA-2 a diferentes MDI del baculovirus BacCap.
- ❑ Evaluar la eficiencia de ensamblaje de cápsides de VAA-2 utilizando diferentes MDI del baculovirus BacCap.
- ❑ Determinar la estabilidad de la expresión de proteínas Rep en diferentes stocks de BacRep.
- ❑ Evaluar el impacto de la expresión de proteínas Rep en la producción de partículas transductoras de vVAA-2
- ❑ Obtener los casetes de expresión de Rep78 y Rep52 para la construcción de baculovirus estables que expresen independientemente estas proteínas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Líneas celulares

Para la producción de cápsides de VAA-2 se utilizó la línea celular Tn5B1-4 (High Five™), proveniente de huevo de *Trichoplusia ni*. Para la producción de baculovirus recombinantes se utilizó la línea Sf9 proveniente de ovario de pupa de *Spodoptera frugiperda*. Ambas líneas se mantuvieron en medio SF-900 II (GIBCO-Invitrogen, USA) libre de suero a 27 °C.

Para evaluar la actividad biológica de los vectores producidos se empleó la línea celular HEK293 EBNA de riñón de embrión humano. Esta línea se mantuvo en medio HSFM (GIBCO-Invitrogen, USA) suplementado con 1% de suero fetal bovino (FBS), 10 mM de HEPES (GIBCO-Invitrogen, USA) y 50 µg/mL de G -418 a 37 °C en atmósfera con CO₂ al 5%.

Baculovirus recombinantes

Se utilizaron los baculovirus recombinantes desarrollados por Urabe et al. (2002), proporcionados por el Dr. Amine Kamen (Biotechnology Research Institute, National Research Council, Canadá) con la autorización del Dr. Robert M. Kotin (NIH, USA). En la tabla 1 se resumen las características de estos baculovirus.

Tabla 1. Baculovirus recombinantes

Baculovirus	Producto	Promotor
BacCap	Proteínas estructurales VP1, VP2 y VP3.	<i>polh</i>
BacRep	Proteínas no estructurales: Rep78 y Rep52.	$\Delta I E-1$ y <i>polh</i> respectivamente
BacGFP	Proteína verde fluorescente (GFP)	<i>p10</i> y de citomegalovirus (CMV) para expresión en células de insecto y de mamífero, respectivamente

Las construcciones que se utilizaron para producir los baculovirus anteriormente descritos se presentan en la figura 5.

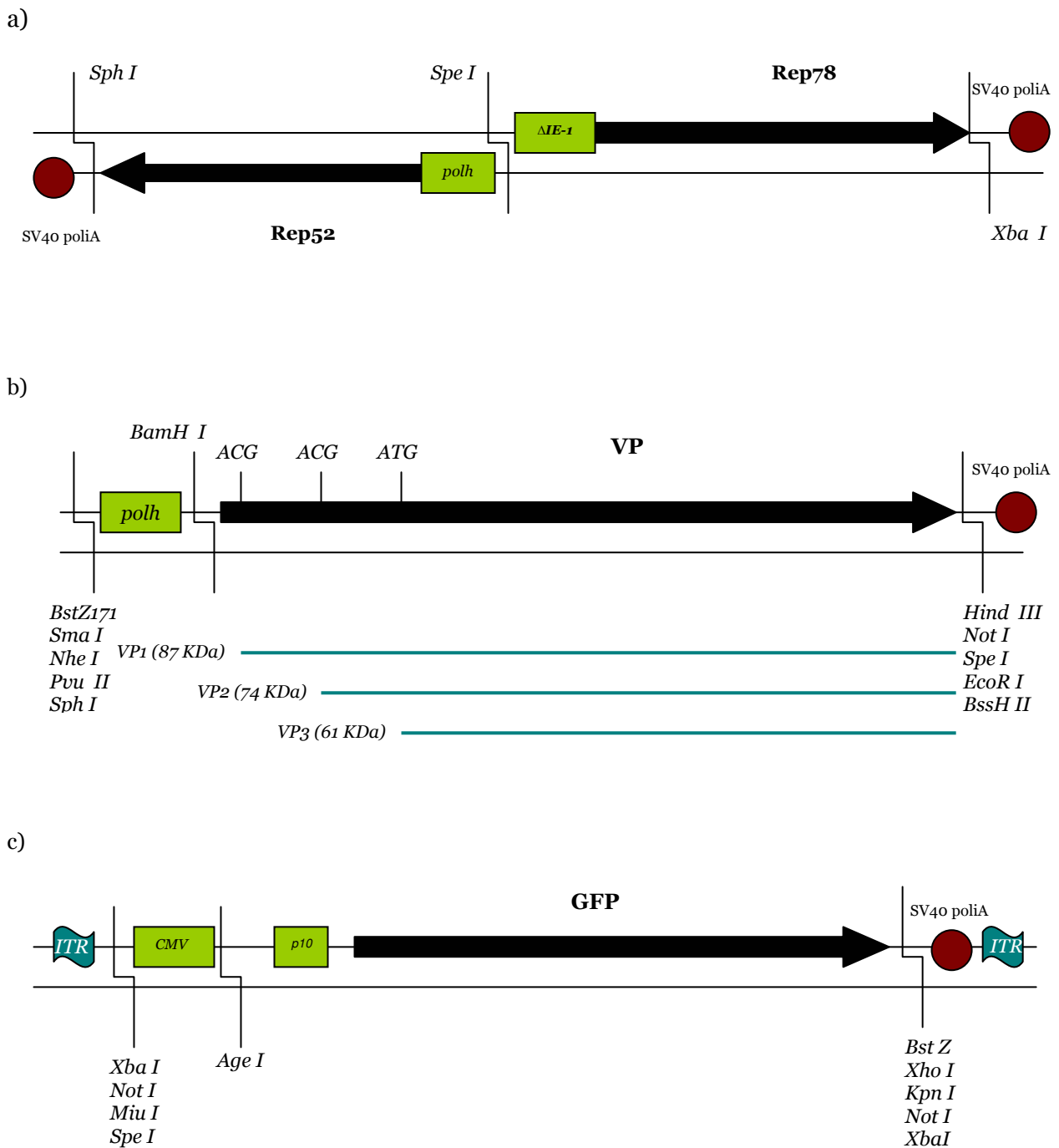


Figura 5. Construcciones realizadas por Urabe et al. (2002) para producir los baculovirus BacRep (a), BacCap (b) y BacGFP (c) (Promotores representados en cuadro verde).

La amplificación de los baculovirus se llevó a cabo en cultivos suspendidos empleando células Sf9 a una concentración de 0.5×10^6 cél/mL e infectando a una MDI de 0.1 UFP/célula. A las 96 hpi los cultivos se centrifugaron a 1000 xg durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante. Se añadió 0.5% de FBS al sobrenadante y se almacenó el stock a 4 °C.

Cultivos celulares y cinéticas de producción de proteínas

Los cultivos de células High Five™ y Sf9 se mantuvieron en matraces de 250 mL con 50 mL de medio SF-900 II libre de suero, agitados a 115 rpm y mantenidos a 27°C. Para llevar a cabo las cinéticas de producción de proteína recombinante empleando diferentes MDI del baculovirus BacCap se sembraron células High Five™ en fase exponencial y con viabilidad mayor del 95% hasta alcanzar una concentración de 3.5×10^6 cél/mL en fase exponencial. Estas células se inocularon a matraces de 250 mL a una concentración de 1×10^6 cél/mL, y en ese momento fueron infectadas. Para estos cultivos se manejó un volumen de trabajo de 50 mL. La concentración y el tamaño celular se determinaron empleando un contador electrónico de partículas (Coulter Multisizer II, Coulter Electronics Inc. USA). La viabilidad se determinó utilizando la técnica de exclusión de azul de tripano en un hematocitómetro.

Los cultivos de células HEK293 EBNA se realizaron en medio HSFM suplementado con 1% de FBS, 10 mM de HEPES y 50 µg/mL de G -418, utilizando frascos T estáticos a 37°C en ambiente humidificado con 5% de CO₂. Para la infección de células HEK293 con vVAA-2 se emplearon cajas de cultivo de 12 pozos con 0.5×10^6 cél/pozo. La concentración y viabilidad celular se determinaron de igual forma que para células de insecto.

Ensayo en placa para el aislamiento de placas virales

Se sembraron células Sf9 (con viabilidad mayor al 95%) en cajas de 6 pozos a una densidad de 1.5×10^6 cél/pozo en un volumen de 3 mL de medio de Grace sin FBS. Las cajas se incubaron 1 h en reposo para que las células se adhirieran. Se prepararon diluciones seriales (10^{-2} a 10^{-6}) de los stocks virales en medio de Grace con 10% de FBS. Posteriormente se retiró el medio y se agregaron 0.75 mL de las diluciones virales. Las cajas infectadas se incubaron a temperatura ambiente por un tiempo de 3-4 h. Al final del período de incubación se removió el inóculo de cada pozo y se añadió una capa de 3 mL de agarosa de bajo punto de fusión (1 vol de agarosa de bajo punto de fusión al 3% + 0.8 vol de medio de Grace 2x + 0.2 vol de FBS) a una temperatura de 37°C. Las cajas se incubaron a 27°C en ambiente húmedo por 4 días. Al concluir el período de incubación se añadieron 2 mL por pozo de una segunda capa de agarosa (1 vol de agarosa al 1.2% + 0.8 vol de medio de Grace 2x + 0.2 vol de FBS + 0.02 vol de rojo neutro al 1%). Se incubó durante 4 h a 27°C en ambiente húmedo para posteriormente identificar las placas virales por la formación de halos incoloros en la capa de agarosa. La formación de dichos halos está relacionada con la presencia de células muertas (por efecto de la infección con baculovirus) que

no retienen el colorante rojo neutro. Las placas se colectaron picando el agar con una pipeta, y se resuspendieron en 1 mL de medio de Grace 1x con 0.5% de FBS.

Se incubaron cajas de 6 pozos con células Sf9 en medio SF-900 II (1×10^6 cél/pozo en 2 mL) a 27°C por 1 h. Se eliminó el medio de cultivo, los pozos se infectaron con 0.5 mL de las placas seleccionadas y se incubó 1 h en agitación. Se añadieron 1.5 mL de medio SF-900 II por pozo y se dejaron incubando a 27°C. A las 96 hpi se centrifugaron las cajas a 2000 xg por 10 min. El pellet celular se colectó para evaluar la expresión de proteína recombinante. El sobrenadante se almacenó a 4°C para posteriormente generar nuevos stocks virales.

Para evaluar expresión de proteínas VP y Rep las células se lavaron con PBS, posteriormente se resuspendieron en 20 µL de agua, se tomó una alícuota de 5 µL que se añadieron a 10 µL de agua y 5 µL de buffer de lisis. Las muestras se hirvieron, y se cargó el mismo volumen de muestra en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 10% que se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para realizar Western blots.

Producción de stocks virales a partir de placas aisladas.

Se infectaron 30 mL de células Sf9 en medio SF-900 II a una concentración de 0.75×10^6 cél/mL con 100 µL del sobrenadante recuperado de la infección de células Sf9 con la placa viral de cada baculovirus identificada como mejor productora de proteína recombinante. El sobrenadante se colectó por centrifugación 96 hpi y se almacenó a 4°C con 0.5% de FBS. Este nuevo stock viral se denominó stock pase 1 (P1).

Determinación de títulos virales

Se realizó mediante la metodología desarrollada por Mena et al. (2003) descrita a continuación:

Se utilizaron cultivos de células Sf9 en fase exponencial con viabilidad mayor de 95%. En cajas de 96 pozos de fondo plano se colocaron 50 µL de medio SF-900 II y 5×10^3 cél/mL. Se prepararon diluciones seriales de los stocks virales (1 a 1×10^{-10}) en medio SF-900 II y se añadieron 10 µL/pozo. Se utilizaron 16 pozos por dilución y 16 pozos como control sin infectar a los cuales se añadieron 10 µL/pozo de medio SF-900 II sin virus. Seis días post-infección se añadieron 10 µL/pozo de una solución stock (5 g/L) de bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Las cajas se incubaron

durante 2 h, se centrifugaron a 2000 xg por 10 min, y se descartó el sobrenadante. Los cristales de sal se solubilizaron con 50 µL de DMSO (dimetil-sulfóxido). Se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (modelo 550; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; USA). Los datos de absorbancia se ajustaron utilizando el paquete Sigmaplot (SPSS, Chicago IL, USA) a la siguiente ecuación de una curva sigmoide:

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

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

$$\text{TCLD}_{50} / \text{mL} = \frac{1}{D_0 V} \quad \text{(Ecuación 2)}$$

$$\log \text{TCID}_{50} / \text{mL} = 0.912(\log \text{TCLD}_{50} / \text{mL}) + 1.674 \quad \text{(Ecuación 3)}$$

$$\text{UFP} = \text{TCID}_{50} / \text{mL} * 0.69 \quad \text{(Ecuación 4)}$$

Análisis de expresión de proteínas

Cuantificación de proteína en microplaca por el método de Bradford

Para cuantificar proteína total en sobrenadante y pellet se colocaron 150 µL de muestra en cajas de 96 pozos, a las muestras se agregaron 6 µL de Tritón X-100 al 0.5% y 50 µL de reactivo Bradford (Bio-Rad). Las muestras se incubaron durante 5 min y se midió la absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas (modelo 550; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA; USA). Se preparó una curva estándar utilizando una solución de albúmina bovina de concentración conocida en un rango de 8 a 80 µg/mL.

Expresión de proteína verde fluorescente (GFP)

La expresión de GFP se evaluó utilizando un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS55. Se excitó a una longitud de onda de 480 nm y se midió fluorescencia a 550 nm empleando un slit de excitación y emisión de 2.5 nm. Las muestras se diluyeron en PBS de manera tal que todas tuvieran la misma concentración en unidades de densidad óptica por mL (DO/mL).

Expresión de proteínas

Las muestras se centrifugaron a 630 xg durante 15 min para separar pellet y sobrenadante. El sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su análisis. El pellet se resuspendió en 100 ó 200 µL de buffer de lisis (50 mM Tris pH 7.5, 5 mM MgCl₂, 150 mM NaCl, 5 U DNAsa I y 5 U RNAsa A por millón de células), y se incubó a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se realizaron 3 ciclos de congelado y descongelado para lisar las células. Este procedimiento consistió en congelar las células sumergiéndolas en una solución de etanol-hielo seco para posteriormente descongelarlas en baño de agua a 37 °C. Finalmente, la suspensión celular se centrifugó a 630 xg durante 15 min a 4 °C, se colectó el sobrenadante y se filtró utilizando una membrana de 0.45 µm. El extracto obtenido de este proceso se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

Se mezclaron 20 ó 10 µg de proteína total con buffer de carga 4X (1 mL 0.5 mM Tris pH 6.8, 1.6 mL SDS al 10%, 200 µL azul de bromofenol al 0.2% p/v, 800 µL glicerol y 400 µL β-mercaptoetanol). Las muestras se hirvieron 10 min y se corrieron en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 8 ó 10% usando buffer Tris-glicina (24.8 mM Tris, 0.192 M glicina, 2 mM EDTA, 0.1% SDS, pH 8.8). Posteriormente se realizó la transferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, USA) en sistema húmedo a corriente constante de 250 mA durante 1 h usando buffer de glicina (192 mM glicina, 25 mM Tris, 20% v/v etanol). Después, las membranas se incubaron 2 h en solución de bloqueo (PBS-Tween 20 al 0.1%, con leche descremada al 5%). Se llevó a cabo 1 lavado de 20 min y 3 lavados de 5 min con buffer PBS-Tween 20 al 0.1% (PBST). Las membranas se incubaron 4 h con anticuerpos monoclonales de origen comercial para proteínas VP (B1 y A69, no. cat. 61058 y 61057 respectivamente) o Rep (Mab259.5, no. cat. 61071) provistos por PROGEN Biotechnik (Alemania), preparados a una dilución 1:1000 en PBST. Se lavaron las membranas tal como ya se describió. Se incubó por 2 h con anticuerpo anti-IgG de ratón marcado con peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories, no. cat. 074-1806) preparado a una dilución 1:2500 en PBST. Las membranas se lavaron tal como se ya se describió para finalmente revelar con carbazol (4.9 mL de carbazol a 8 mg/mL, 12 mL de

buffer de acetatos 0.05 M pH5, 30 μ L de peróxido de hidrógeno al 30%) o con reactivos quimioluminiscentes (Amersham Pharmacia Biotech).

Las imágenes digitales de las membranas se analizaron utilizando los paquetes NIH Image 1.61/Fat o ImageJ 1.36b para cuantificar la cantidad relativa de cada proteína mediante densitometría de las películas de Western blot.

Anticuerpos monoclonales

Las características de los anticuerpos monoclonales utilizados en Western blots para identificar proteínas y cápsides de VAA-2 se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2. Anticuerpos monoclonales murinos contra proteínas y partículas de VAA-2.

Anticuerpo	Proteína que reconoce	Región de unión	Forma que reconoce
259.5 (Wistuba et al., 1995; Wistuba et al., 1997)	Rep78, Rep68, Rep52 y Rep40	No determinada	Nativa y desnaturalizada
B1 (Wistuba et al., 1995; Wistuba et al., 1997)	VP1, VP2 y VP3	aa726 – aa733 del extremo carboxilo común a las 3 proteínas. (Wobus et al., 2000)	Nativa no ensamblada y desnaturalizada
A69 (Wistuba et al., 1995; Wistuba et al., 1997)	VP1 y VP2	aa169 – aa184 de VP1 y VP2; y (en mucho menor intensidad) aa123 – aa136 de VP1 (Wobus et al., 2000)	Nativa no ensamblada y desnaturalizada
A20 (Wistuba et al., 1995; Wistuba et al., 1997; Grimm et al., 1999)	VP1, VP2 y VP3	aa271 – aa280, aa369 – aa378 (principalmente), aa533 – aa542, aa566 – aa575, todas ellas son regiones comunes a VP1, VP2 y VP3 (Wobus et al., 2000)	Ensamblada. Cápsides con las 3 VP, y además cápsides con sólo VP2 y VP3 (Wistuba et al., 1997)

Preparación de curvas estándar para proteínas VP

En un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 8% se cargaron volúmenes determinados de preparaciones de VAA-2 obtenidas en infecciones de células High Five™ con BacCap. La integridad de estas preparaciones se observó utilizando tinción con Coomassie, y se seleccionó una de ellas como estándar de cápsides de VAA-2. La imagen del gel se digitalizó para realizar el análisis densitométrico de todas las bandas presentes en la muestra elegida como estándar,

donde se consideró como valor de unidades densitométricas (UD) al producto de la intensidad de cada banda por su área. A partir de este análisis se calculó la cantidad en μg de cada proteína VP usando la siguiente relación:

$$X \mu\text{g de cada VP} = \frac{\mu\text{L estándar} * \text{conc.} (\mu\text{g}/\mu\text{L}) * \text{UD de la banda correspondiente a cada VP}}{\text{Sumatoria de las UD de todas las bandas presentes en el estándar}}$$

Los μmoles de VP1, VP2 y VP3 en el estándar se obtuvieron al dividir los μg obtenidos para cada VP entre su respectivo peso molecular. Conociendo estos valores se pudieron determinar los μmoles de cada VP presentes en diferentes volúmenes del estándar.

En otro gel desnaturante de poliacrilamida al 8%, se cargaron diferentes volúmenes del mismo estándar de VAA-2. La proteína se transfirió a membranas de nitrocelulosa y se llevaron a cabo inmunoblots utilizando los anticuerpos B1 y A69 de manera independiente para obtener curvas estándar de concentración para las diferentes proteínas VP con cada anticuerpo. Se determinaron los μmol de cada VP en los diferentes volúmenes empleados, y las UD de cada VP con cada anticuerpo a partir de las imágenes digitales de las membranas. Utilizando estos datos se realizaron gráficas de UD contra μmol de VP para cada anticuerpo. Las ecuaciones obtenidas para cada proteína con cada anticuerpo se presentan en las tablas 6 y 7 de la sección *Resultados y Discusión*.

Análisis densitométrico de películas de Western blot

Con el objeto de correlacionar los datos obtenidos en diferentes membranas con muestras problema incubadas con el mismo anticuerpo se preparó un gel desnaturante de poliacrilamida al 8% donde se corrió la muestra con el valor máximo de UD de cada “membrana problema” junto con un estándar de proteína VP de concentración conocida. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa que se incubó con el mismo anticuerpo utilizado durante el primer análisis densitométrico. Se dividieron las UD del estándar de VP en la “membrana de máximos” entre las UD del mismo estándar en la curva de calibración incubada con el respectivo anticuerpo para obtener un cociente con el cual normalizar las UD del resto de las muestras. Al dividir las UD de las muestras en la “membrana de máximos” entre este cociente se obtuvieron valores de UD normalizados respecto a la curva estándar. Posteriormente, el valor de UD máximo de cada membrana problema se dividió entre su respectivo valor de UD normalizado en la “membrana de máximos”. Este nuevo cociente,

exclusivo para cada membrana problema, se utilizó para dividir los valores de UD del resto de las muestras en la membrana para obtener también valores de UD normalizados con respecto a la curva estándar. Con estos valores se calculó la cantidad de μ moles de VP utilizando las ecuaciones obtenidas de las curvas realizadas para cada anticuerpo.

Purificación de cápsides de VAA por ultra-centrifugación

Se cosecharon cultivos infectados con viabilidad menor de 30% y se separó el sobrenadante del pellet por centrifugación. El pellet se resuspendió en 10 mL de buffer de lisis y se procesó como se indica en la sección *Expresión de proteínas*. El extracto de pellet se filtró usando membrana de poro de 1.2 μ m (Millipore, USA) para posteriormente concentrarse, al igual que los sobrenadantes, utilizando centricones con membrana de 30 KDa (Millipore, USA). Se transfirieron los concentrados de extracto de pellet o sobrenadante a tubos de ultra-centrífuga (Beckman, U. K.) y se adicionó CsCl hasta alcanzar una concentración de 0.39 g/mL. El volumen final se ajustó a 4.5 mL con buffer TNC (1.58 g/L Tris-HCl, 8.18 g/L NaCl, pH 7.5). Se centrifugó a 35000 rpm durante 18 h utilizando un rotor sw50.1 (Beckman, U.K.). Se colectaron las bandas y se determinó su densidad midiendo su índice de refracción. La pureza e integridad de las partículas se analizó por medio de electroforesis desnaturizante con tinción de Coomassie, y microscopía electrónica utilizando tinción negativa.

Cuantificación de cápsides de VAA empleando cromatografía de exclusión en gel

Se utilizó un equipo de HPLC marca Waters™ (Milford, MA, USA) con los siguientes componentes: sistema de bombas Waters™ 626, controlador Waters™ 600S, detector de fluorescencia Waters™ 2475 (λ_{exc} 280 nm, λ_{em} 380 nm), detector de arreglo de diodos Waters™ (λ_{exc} 280 nm). Se empleó buffer 10 mM de Na_2HPO_4 pH 8, operando a un flujo de 0.9 mL/min a 37°C, y las columnas de permeación en gel Waters™ Ultrahydrogel 2000 y Waters™ Ultrahydrogel 500 en serie (Waters™, Milford, USA). Ambas columnas poseen dimensiones de 7.8 mm de diámetro x 300 mm de longitud, y tamaños de poro de 200 y 50 nm respectivamente. Para proteger a ambas columnas se utilizó una precolumna Ultrahydrogel de 6 mm de diámetro x 40 mm de longitud. Como fase móvil se empleó un buffer de fosfatos 10 mM pH 8.0

Determinación del tamaño de partícula

Para determinar el tamaño de partícula con base en los tiempos de elución de las distintas fracciones colectadas se utilizaron las ecuaciones derivadas de la curva de calibración desarrollada por Fabián-Macedo (2007) (figura 6), quien empleó el mismo sistema cromatográfico y fase móvil utilizados en este trabajo.

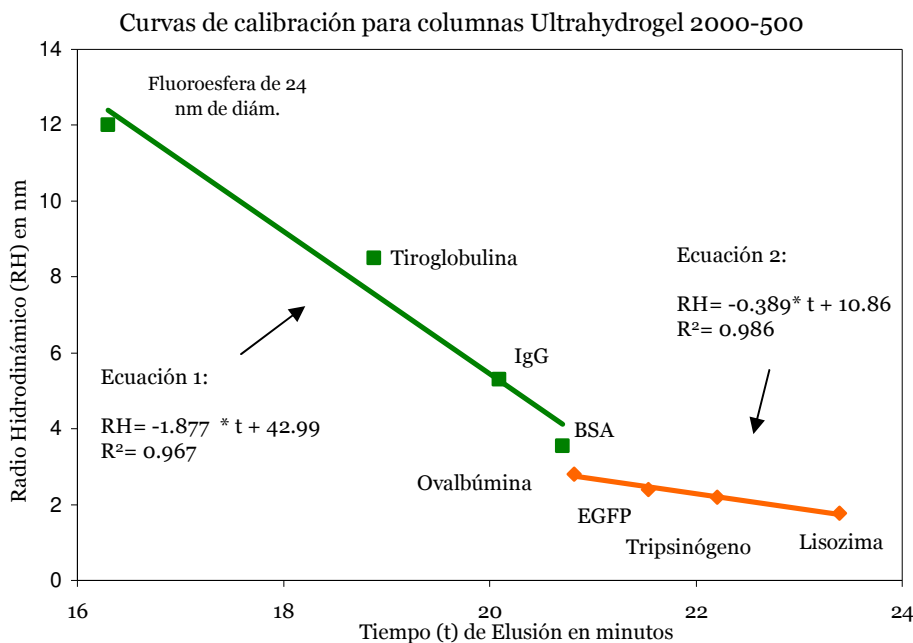


Figura 6. Curvas de calibración para determinación de radios hidrodinámicos utilizando el sistema de columnas Ultrahydrogel 2000 y Ultrahydrogel 500 en serie con precolumna, usando buffer de fosfatos 10 mM a pH 8 (tomada de Fabián-Macedo, 2007). La ecuación 1 se determinó tomando en cuenta los puntos en verde de la curva, la ecuación 2 se determinó considerando los puntos de la curva señalados en naranja.

Cálculo de rendimientos de partículas ensambladas

Para cuantificar cápsides de VAA se determinó en los cromatogramas obtenidos para cada muestra el área bajo la curva correspondiente a la fracción de interés (FI). Al dividir el área de FI entre el área total obtuvimos la fracción que representa la proteína ensamblada con respecto a la total inyectada. La concentración de proteína inyectada (CPI) se calculó al dividir la concentración de proteína total de cada muestra entre el volumen de muestra tomado y el volumen al cual se diluyó la muestra. Posteriormente se dividió la CPI entre la fracción de proteína que representa FI con respecto a la total inyectada para obtener μg de proteína ensamblada por mL (PE/mL). Adicionalmente, se calcularon los μg de proteína VP total inyectados para cada muestra. Para ello tomamos, para cada muestra, las concentraciones de

VP1, VP2 y VP3 determinadas en la cinética de producción VP's. La proteína VP inyectada por mL (VP iny/mL) resultó de la suma de las concentraciones, en µg/mL, de las 3 proteínas VP.

Para obtener los rendimientos de ensamblaje simplemente dividimos PE/mL entre VP iny/mL, el cociente obtenido se multiplicó por 100 para representar los valores en porcentaje. Para obtener las cápsides de VAA por mL de muestra se realizó el siguiente cálculo:

$$\frac{\text{Cápsides VAA}}{\text{mL}} = \frac{X \mu\text{g de PE}}{\text{mL}} * \frac{1 \text{ Da}}{1 \times 10^6 \mu\text{g}} * \frac{1 \text{ mol VAA}}{3.98 \times 10^6 \text{ Da}} * \frac{6.023 \times 10^{23} \text{ cápsides}}{1 \text{ mol VAA}}$$

Cuantificación de ADN residual

Para cuantificar la cantidad de ADN presente en las fracciones recolectadas a partir de HPLC de exclusión en gel se utilizó el kit Quant-it™ PicoGreen® (Molecular Probes™, Invitrogen) usando la metodología descrita en el manual de Quant-it™ PicoGreen® dsDNA reagent and kits (Invitrogen, MPO7581) que se describe a continuación:

Se preparó una solución stock de ADN de concentración conocida usando estándar ADN λ, posteriormente se realizaron soluciones seriales utilizando buffer TE. Se preparó además una solución de trabajo del colorante PicoGreen® diluyéndolo 200 veces en buffer TE 1X, el volumen preparado fue considerando 1 mL de colorante por muestra. Esta solución de trabajo se mantuvo protegida de la luz todo el tiempo. La reacción se llevó a cabo mezclando volúmenes iguales de muestra y colorante, se dejó incubar en oscuridad por 2-5 min. Se midió fluorescencia en un espectrofluorímetro Perkin Elmer LS55 utilizando una longitud de onda de excitación de 480 nm y de emisión de 520 nm, usando un slit de excitación de 5 nm y un slit de emisión de 4 nm. La ganancia del espectrofluorímetro se ajustó utilizando una reacción con 1 µg/mL de ADN estándar. Se construyó una curva estándar graficando concentración de ADN en muestras estándar contra fluorescencia. Usando la ecuación obtenida a partir de esta curva se calculó la concentración de ADN presente en muestras problema.

Microscopía electrónica de transmisión de partículas virales con tinción negativa

Se colocaron 5 µL de muestra de virus en una rejilla de cobre de 300 mesh cubierta con formvar y vaporizada al carbón. Se dejó secar la muestra por 5 min a temperatura ambiente. La rejilla se

lavó con tres gotas independientes de agua destilada filtrada con membrana de 0.45 μm . La rejilla se colocó 1 ó 2 minutos sobre una gota de acetato de uranilo, posteriormente se removió el exceso de acetato de uranilo con un papel filtro. La rejilla se lavó como ya se describió. Por último, se dejó secar la rejilla y se observó en microscopio electrónico (EM-900 Zeiss) a 80 KV.

Estudio de producción de proteínas Rep y vVAA utilizando diferentes stocks virales de BacRep

Para producir vVAA se inocularon células Sf9 en medio SF-900 II a una concentración inicial de 1×10^6 cél/mL. Cuando se alcanzó una concentración celular de 2×10^6 cél/mL se infectó con BacRep, BacCap y BacGFP a MDI de 5 UFP/cél de cada baculovirus. Los stocks virales de BacCap y BacGFP corresponden al pase 3, mientras que para BacRep se utilizaron 3 diferentes stocks correspondientes a los pases 2, 3 y 4, todos ellos generados en el laboratorio del Dr. Amine Kamen (Biotechnology Research Institute, National Research Council, Canadá). Adicionalmente se realizaron infecciones individuales con los 3 diferentes stocks de BacRep en células Sf9 a las condiciones utilizadas durante las coinfecciones. Las células se cosecharon 72 hpi para el análisis de proteínas y de partículas transductoras. En el análisis de Western blot se utilizó el anticuerpo monoclonal MAB689P (Maine Biotechnology Services) para detectar proteínas Rep y se reveló utilizando reactivos quimioluminiscentes.

Evaluación de la capacidad transductora de los vVAA

Para evaluar la capacidad transductora de las partículas de vVAA se realizó el ensayo de transferencia de genes tal como fue reportado por Aucoin et al. (2006), mismo que se detalla a continuación:

Se tomó 1 mL de los cultivos de células Sf9 coinfectados con BacCap, BacRep y BacGFP, y se llevaron a cabo 3 ciclos de congelado y descongelado. Los lisados celulares se incubaron a 60 °C por 15 min para inactivar los baculovirus. Posteriormente se realizaron diluciones seriales de los en medio HSFM. Con estas diluciones se infectaron células HEK293 EBNA previamente infectadas con adenovirus silvestre (ATCC número VR-1516) a MDI de 50 UFP/cél. Las infecciones se realizaron en placas de cultivo de 12 pozos con 0.5×10^6 células por pozo. Las placas se incubaron 24 h a 37°C agitadas a 100 rpm. Las células fueron cosechadas, resuspendidas en 1 mL de PBS y fijadas con 2% de formaldehído. Las células se analizaron con un citómetro de flujo Coulter EPICS™ XL-MCL (Beckman-Coulter, Miami, FL) equipado con

láser de argón (488 nm) de 15 mW. La calibración del citómetro de flujo se llevó a cabo utilizando fluoroesferas de tamaños estándar (Coulter, Miami, FL). La fluorescencia de la GFP se detectó utilizando un filtro dicróico *long-pass* de 550 nm y un filtro *band-pass* de 525 nm. En cada medición se colectó un mínimo de 10000 eventos. Los datos se colectaron utilizando el software EXPO™.

Extracción de ADN de Baculovirus

Se utilizó la metodología reportada en el manual de Bac-N-Blue™ (Invitrogen™. Life Technologies, Version 2002), misma que se describe a continuación:

Se transfirieron 0.6 mL de stock viral a un tubo de microcentrífuga y se añadieron 0.75 mL de polietilenglicol al 20% en NaCl 1 M a 4°C. Se dejó reposar 30 min a temperatura ambiente. Se centrifugó a 20817 xg por 10 min a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante del pellet. Se añadieron 100 µl de agua estéril al pellet y 10 µL de proteinasa K (SIGMA) (5-10 mg/mL), posteriormente se incubó a 50°C por 1 h. Se añadieron 110 µL de fenol:cloroformo (1:1), se agitó vigorosamente y se centrifugó a 20817 xg por 5 min a temperatura ambiente. Se transfirió la fase acuosa a un tubo estéril y se precipitó el ADN añadiendo 2 volúmenes de etanol absoluto. Se incubó a -20°C por al menos 20 min. Se centrifugó a 20817 xg durante 15 min a 4°C. El pellet obtenido se lavó con etanol al 70%. Finalmente, se resuspendió el pellet en 10 µL de agua estéril libre de DNAsas y se almacenó el ADN a -20°C hasta su uso.

Amplificación de ADN viral

Se amplificó el ADN extraído de los baculovirus BacRep y BacGFP utilizando los oligos diseñados en este trabajo, los cuales se describen en la sección de *Resultados y Discusión*. El programa utilizado para llevar a cabo la reacción de PCR se muestra en la tabla 3. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo utilizando un termociclador Hybaid modelo PCR Sprint y los reactivos señalados en la tabla 4. Los productos de PCR se corrieron en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (Et-Br) en buffer TBE (10.8 g Tris, 5.5 g ácido bórico, 2 mL EDTA 0.5 M pH 8.0). En los casos en que fue necesario confirmar la secuencia de los productos de PCR se llevó a cabo la purificación de los productos de interés utilizando el kit Wizard (Promega®).

Tabla 3. Programa para ciclos de reacción de PCR.

Temperatura (°C)	Tiempo (min)	Ciclos
94	2	1
94	1	30
56	2	
72	3	
72	7	1

Tabla 4. Reactivos para reacción de PCR.

Reactivo	Volumen (μL)
10 mM dNTP's	1
25 mM MgSO ₄	4
Buffer 10x Vent DNA polimerasa	5
Vent DNA polimerasa (2 U/μL)	0.25
DNA viral	5
Oligo Forward (25 μM)	2
Oligo Reverse (25 μM)	2
Agua libre de nucleasas	30.75
Volumen Total	50

Construcción de baculovirus recombinantes.

Con el fin de obtener las secuencias de Rep78 y Rep52 para la construcción de nuevos baculovirus recombinantes que expresen dichas proteínas por separado se utilizó el plásmido pFBDLSR (Urabe et al., 2002) proporcionado por el Dr. Robert Kotin (NIH, USA) para extraer los casetes de expresión de Rep78 y Rep52 y posteriormente clonarlos en el plásmido pFastBac1 (Invitrogen™). Debido a que en pFBDLSR cada Rep tiene su propio promotor, se decidió eliminar el promotor *polh* del plásmido pFastBac-1 mediante digestiones con las enzimas de restricción *SnaB* I y *Xba* I o con *SnaB* I y *Sph* I, para producir los plásmidos lineales pFastBac-a y pFastBac-b respectivamente. pFastBac-a se generó para la ligación con Rep78 y pFastBac-b para la ligación con Rep52. Para obtener las secuencias de ambas Rep se diseñaron pares de oligos que sirvieran para extraer la secuencia de cada proteína con su respectivo promotor por medio de amplificaciones por PCR a partir del plásmido pFBDLSR (figura 7). En el diseño de dichos oligos, que se representa detalladamente en la figura 7, se incluyeron sitios de restricción para las enzimas *Xba* I y *Sph* I (para Rep78 y Rep52 respectivamente).

El tamaño de los productos de PCR se verificó en geles de agarosa al 1% con Et-Br. Los amplicones de tamaño aproximado al esperado se enviaron a secuenciar para confirmar la identidad de la región amplificada. Los amplicones con las secuencias esperadas se sometieron a reacciones de digestión con enzimas de restricción para posteriormente ser clonados en el vector pFastBac1 (Invitrogen™), el cual fue previamente tratado con enzimas de restricción para eliminar la región promotora.

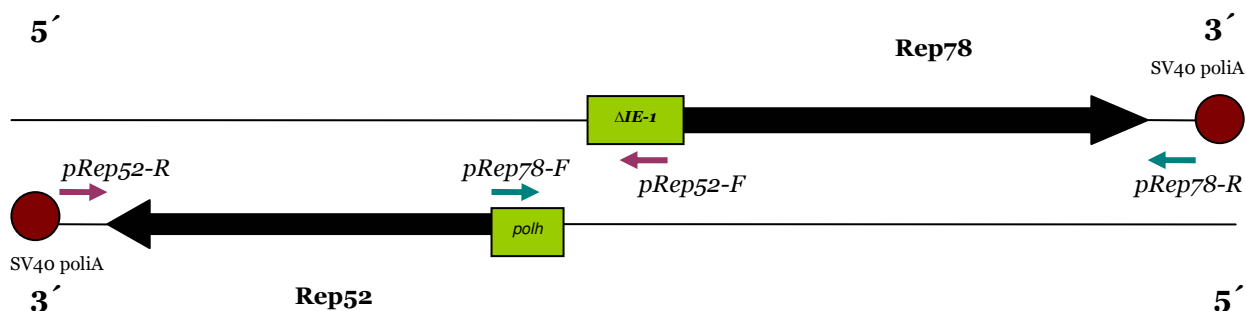


Figura 7. Diseño de oligos para amplificación de los casetes de expresión de Rep78 y Rep52 a partir del plásmido pFDLSR (Urabe et al., 2002). Los oligos pRep78-R y pRep52-R se diseñaron sobre la secuencia del vector pFastBacDual (Invitrogen™), en el cual se encuentran clonadas estas proteínas, y contienen sitios de restricción para las enzimas de *Xba I* y *Sph I* respectivamente.

Digestión con enzimas de restricción

Las reacciones se llevaron a cabo a 37°C durante 12 h. Después de este período se llevó a cabo un calentamiento a 70°C durante 20 min para inactivar las enzimas de restricción. Las reacciones se llevaron a cabo colocando los reactivos que se describen en la tabla 5.

Tabla 5. Reactivos para reacción de digestión con enzimas de restricción.

Templado:	250–500 µg de ADN
Enzima de restricción:	<i>SnaB I</i> : 2.5 U <i>Xba I</i> : 10 U <i>Spe I</i> : 5 U
Buffer de reacción 10X:	5 µL
Agua libre de nucleasas:	Volumen para completar 50 µL

Ligación de ADN

Se colocaron 50 ng del vector linearizado con 150 ng del inserto en un volumen final de 17 µL. Esta mezcla se incubó a 45°C por 5 min. Posteriormente se colocó en hielo y se añadieron 1 µL de T4 DNA ligasa (400 U/ µL) y 2 µL de buffer T4 DNA ligasa 10X. Esta mezcla se incubó a 16°C

por 2–3 h. Finalmente, se incubó durante 10 min a 65°C para inactivar la DNA ligasa. Se utilizaron 10 µL de esta mezcla para transformar células de *E. coli* TOP-10 competentes.

Transformación de células competentes

Se añadieron 25 ng de ADN a un vial (50 µL) con células *E. coli* TOP-10. Se incubó en hielo durante 20 min. Se llevó a cabo un choque térmico a 42°C por 2 min (sin agitación). Posteriormente se incubó en hielo durante 10 min. Se añadieron 400 µL de medio SOC (2% triptona, 0.5% extracto de levadura, 0.05% NaCl, 10 mL KCl 250 mM pH7, 10 mL MgCl₂ 1M y 10 mL glucosa 2 M esterilizada por filtración) y se incubó a 37°C durante 1.5 h. Finalmente se sembraron 50 y 100 µL de células en placas LB + ampicilina (1% triptona, 0.5% extracto de levadura, 1% NaCl, 1.5% agar, 0.1 mg/mL ampicilina, pH 7.0). Las placas se incubaron a 37°C durante 10-12 h.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El estudio de la producción de vectores de virus adeno-asociado se dividió en 3 etapas. En la primera se analizó la producción de proteína VP en cultivos infectados con BacCap, también se analizaron los rendimientos de ensamblaje de cápsides de VAA. Se discuten además los retos metodológicos abordados durante la cuantificación de proteína VP total y ensamblada en cápsides de VAA. En la segunda etapa se evaluó el efecto de la expresión de proteínas Rep sobre los rendimientos de producción de partículas de VAA con capacidad transductora, así mismo se evaluó la expresión de proteínas Rep utilizando stocks virales de diferente número de pase. En la tercera etapa se propusieron algunas estrategias para mejorar la expresión de proteínas Rep, así como para abordar el estudio de producción de genomas recombinantes para vectores de VAA.

Obtención de un estándar de VAA-2

Purificación de cápsides de VAA por ultra-centrifugación

El método tradicional por el cual se lleva a cabo la purificación de cápsides de VAA es la ultra-centrifugación utilizando gradientes de CsCl. Este método se basa en la formación de un gradiente de densidad (δ) en el seno del líquido y donde las partículas suspendidas en éste migran a la región del gradiente que posee su misma densidad. El gradiente se forma como consecuencia de la fuerza centrífuga, alcanzando la mayor densidad en el fondo del recipiente y la menor en la capa superior del líquido. Debido a esto, la purificación con este método posibilita la separación de cápsides vacías de VAA ($\delta=1.33$ g/cm³) y cápsides con ADN ($\delta=1.37 - 1.40$ g/cm³), de las partículas semi-ensambladas y la proteína no ensamblada (Urabe et al., 2002). La principal desventaja de este método reside en los bajos rendimientos de recuperación, y en la disminución observada en la infectividad de las partículas obtenidas (Auricchio et al., 2001).

Se utilizó este método con el fin de purificar cápsides vacías de VAA en cantidad tal que pudieran ser utilizadas como estándares para la cuantificación de proteína VP en ensayos posteriores. Para ello se infectaron células High Five con el baculovirus BacCap a diferentes MDI. En estas muestras, sometidas a ultra-centrifugación con gradientes de CsCl, se detectaron bandas de densidad cercana a la reportada para VAA-2. Las bandas más intensas se observaron en muestras provenientes de extractos de pellet (figura 8). Se colectaron 2 bandas por muestra, b1 y b2. La densidad de b1 fue de 1.31 g/cm³ mientras la de b2 fue de 1.32 g/cm³, por lo que era

probable encontrar partículas correctamente ensambladas en ambas bandas, lo cual se corroboró por medio de microscopía electrónica.

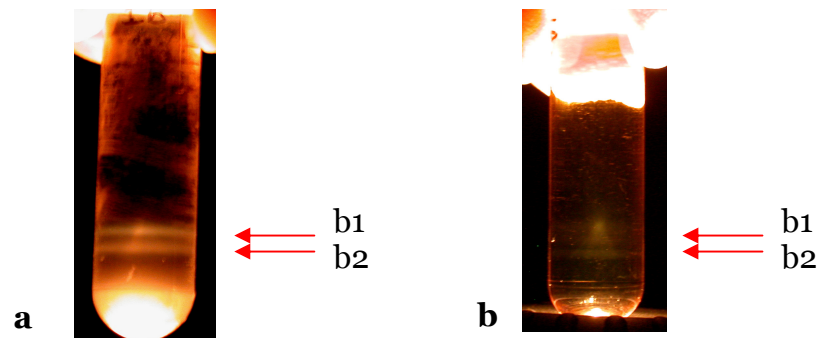


Figura 8. Bandas obtenidas por gradientes de CsCl a partir de muestras de pellet (a) y sobrenadante (b).

El análisis por SDS-PAGE de las bandas b1 y b2 permitió observar la estequiometría de las proteínas VP por medio de tinción con Coomassie (figura 9). Pese a que se esperaba observar sólo las 3 bandas correspondientes a VP1, VP2 y VP3 de VAA se observó una gran cantidad de bandas de peso molecular menor al de VP3 (61KDa), la menor y más abundante de las proteínas estructurales de VAA-2. Mediante inmunoblot con el anticuerpo B1, capaz de reconocer a las 3 VP, se confirmó que estas bandas de menor peso molecular (PM) corresponden a fragmentos de proteínas VP. Esta observación coincide con otros reportes en donde los “purificados” de partículas de VAA muestran contaminación con grandes cantidades de proteína degradada (Auricchio et al., 2001; Urabe et al., 2002). Este análisis también permitió observar que la concentración de VP3 es menor en bandas de igual densidad recolectadas a partir de muestras de sobrenadante (muestras 1AsII, 5AsI y 5As II de la figura 9) que en las obtenidas de pellet. Esta observación podría implicar que en la fracción de sobrenadante se acumulan principalmente cápsides con estequiometría distinta de la reportada.



Figura 9. Gel teñido con Coomassie de SDS-PAGE de muestras purificadas por ultra-centrifugación usando gradientes de CsCl. En todos los carriles se cargó la misma cantidad de proteína total.

Con base en la estequiometría observada entre VP1, VP2 y VP3, se eligió como estándar de proteína VP de VAA-2 a la muestra 5BII (figura 9). Esta muestra corresponde a la b2 obtenida a partir del gradiente usando un extracto de pellet. La relación molar en este estándar fue de 1:1.4:4.3 para VP1:VP2:VP3. Si bien, por tratarse de cápsides se esperaba una relación similar a la reportada (1:1:10), es probable que la discrepancia sea debida al arrastre de proteína desensamblada durante la migración de las partículas en el gradiente. Se observó que el perfil electroforético de la muestra 5BI es casi idéntico al de la muestra 5BII (figura 9), sin embargo, no se seleccionó la muestra 5BI como estándar debido a que las bandas correspondientes a VP1 y VP2 fueron menos evidentes, lo cual dificultaría su identificación al utilizar bajas concentraciones del estándar en las curvas de cuantificación. Debido a la gran cantidad de proteína degradada observada en el estándar de proteína VP se decidió confirmar la presencia de cápsides ensambladas utilizando microscopía electrónica.

Los fragmentos de proteína VP degradada presentes en el estándar 5BII, cuantificados por densitometría, corresponden aproximadamente al 50% de la proteína total colectada en la banda, lo que indica que al menos el 50% de la proteína se encuentra desensamblada. Este valor representa un porcentaje de pureza muy bajo, en especial considerando la aplicación terapéutica de estas partículas. Por tanto, resulta evidente que para la purificación de cápsides de VAA es más conveniente utilizar otros métodos de purificación tales como la cromatografía de afinidad (Schnepp y Clark, 2000; Auricchio et al., 2001), la cromatografía de intercambio iónico o la cromatografía de permeación en gel (Smith et al., 2003).

Preparación de curvas estándar para cuantificación de proteínas VP

Los estudios existentes sobre producción de vVAA se han centrado en la producción de cápsides ensambladas y cápsides con capacidad transductora. Sin embargo, nunca se ha analizado el potencial de los sistemas recombinantes en cuanto a la producción de proteína VP y su capacidad para ensamblarla en cápsides completas. En este estudio se analizó la capacidad del sistema de células de insecto-baculovirus para producir proteína VP utilizando el baculovirus BacCap. Con este fin se desarrolló y estandarizó un método de cuantificación de proteína VP basado en densitometría de películas de Western blot usando el estándar 5BII y los anticuerpos monoclonales comerciales B1 y A69 (figura 10). Las curvas de cuantificación se prepararon considerando que 23.22 μg del estándar 5BII contenían 9.58×10^{-5} μmoles de VP3, 3.20×10^{-5} μmoles de VP2 y 2.21×10^{-5} μmoles de VP1, estos datos se obtuvieron utilizando la relación matemática descrita en la sección *Preparación de curvas estándar para proteínas VP*.

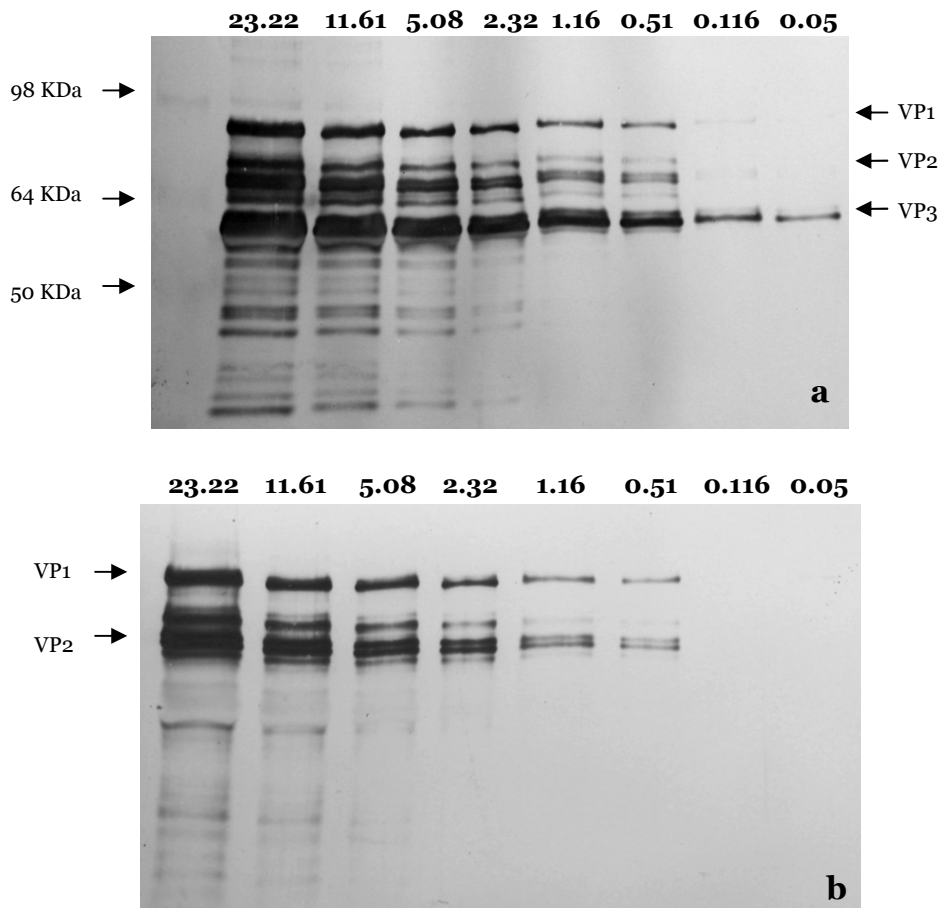


Figura 10. Western blot de curva de cuantificación de proteína VP usando los anticuerpos B1 (a) y A69 (b). Los carriles indican µg de proteína total en el estándar.

En la figura 10 se observa un patrón de degradación de proteína VP en el estándar distinto para los 2 anticuerpos empleados. B1 posee la misma afinidad para las 3 VP ya que reconoce una región del extremo C-terminal común a VP1, VP2 y VP3, mientras que A69 reconoce una región común únicamente para VP1 y VP2. La banda de PM intermedio entre VP1 y VP2 confirma que hay degradación de VP1. La banda de VP2 se observó como una banda doble al utilizar el anticuerpo A69, en este caso se tomaron en cuenta ambas bandas en la cuantificación de las UD por lo que la cuantificación de esta proteína con A69 podría estar sobre-estimada. La señal obtenida para VP2 en los 4 puntos de mayor concentración de la curva fue más intensa con A69 que con B1; sin embargo, en los puntos de menor concentración la señal fue más intensa con el anticuerpo B1. Esto no fue así para VP1, donde la señal obtenida fue siempre mayor cuando se utilizó el anticuerpo B1. Dado que fue posible detectar menores concentraciones de proteína VP1 y VP2 con B1 que con A69, utilizamos las ecuaciones obtenidas con B1 para la cuantificación de estas proteínas. También se puede suponer que la afinidad de B1 por estas proteínas es mayor que la de A69. A partir de las imágenes mostradas en la figura 10 se obtuvieron las ecuaciones presentadas en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Ecuaciones obtenidas a partir de inmunoblot con el anticuerpo B1.

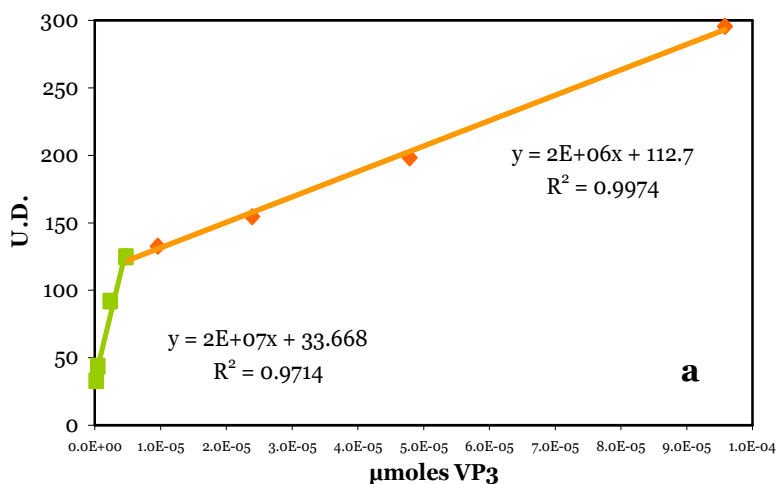
Proteína	Ecuación	R ²	Intervalo de cuantificación (μmol de VP)
VP3	$\mu\text{mol VP}_3 = (\text{UD} - 112.70) / 1.88 \times 10^6$	0.997	$9.58 \times 10^{-5} - 4.79 \times 10^{-6}$
VP3	$\mu\text{mol VP}_3 = (\text{UD} - 33.69) / 2.00 \times 10^7$	0.971	$4.79 \times 10^{-6} - 2.39 \times 10^{-7}$
VP2	$\mu\text{mol VP}_2 = (\text{UD} - 47.21) / 4.76 \times 10^6$	0.998	$3.20 \times 10^{-5} - 1.60 \times 10^{-6}$
VP2	$\mu\text{mol VP}_2 = (\text{UD} - 28.64) / 1.37 \times 10^7$	0.912	$1.60 \times 10^{-6} - 1.60 \times 10^{-7}$
VP1	$\mu\text{mol VP}_1 = (\text{UD} - 27.14) / 5.52 \times 10^6$	0.995	$2.21 \times 10^{-5} - 1.11 \times 10^{-6}$
VP1	$\mu\text{mol VP}_1 = (\text{UD} - 12.12) / 2.12 \times 10^7$	0.999	$1.11 \times 10^{-6} - 1.11 \times 10^{-7}$

Tabla 7. Ecuaciones obtenidas a partir de inmunoblot con el anticuerpo A69.

Proteína	Ecuación	R ²	Intervalo de cuantificación (μmol de VP)
VP2	$\mu\text{mol VP}_2 = (\text{UD} - 57.7) / 5.10 \times 10^6$	0.986	$3.20 \times 10^{-5} - 3.20 \times 10^{-6}$
VP2	$\mu\text{mol VP}_2 = (\text{UD} - 11.3) / 1.73 \times 10^7$	0.997	$3.20 \times 10^{-6} - 7.99 \times 10^{-7}$
VP1	$\mu\text{mol VP}_1 = (\text{UD} - 20.4) / 5.07 \times 10^6$	0.993	$2.21 \times 10^{-5} - 2.21 \times 10^{-6}$
VP1	$\mu\text{mol VP}_1 = (\text{UD} - 9.16) / 1.04 \times 10^7$	0.964	$2.21 \times 10^{-6} - 5.53 \times 10^{-7}$

En los intervalos de concentración que se utilizaron en las curvas de cuantificación la señal obtenida para las 3 VP se ajustó a 2 regiones lineales tanto con B1 (figura 11) como con A69; además, la respuesta obtenida dependió de la concentración de proteína empleada y por tanto no se consideró una señal saturada. Para ambos anticuerpos, la mayoría de las muestras presentaron valores de UD correspondientes a la zona de la curva señalada en verde.

Este método de cuantificación resultó sumamente práctico para cuantificar proteína VP presente en extractos de pellet y sobrenadante.



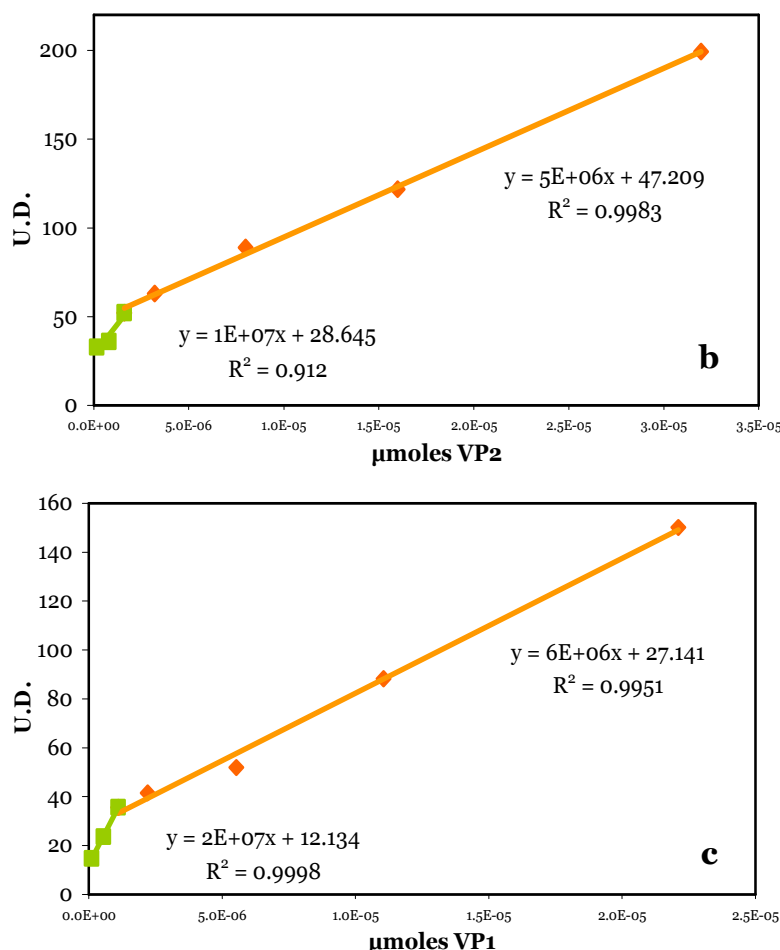


Figura 11. Curvas estándar para VP3 (a), VP2 (b) y VP1 (c) obtenidas con el anticuerpo B1.

Microscopía electrónica de transmisión de partículas de VAA

Para analizar muestras crudas provenientes de cultivos infectados se realizaron varios depósitos de proteína sobre la rejilla con el fin de aumentar la concentración de cápsides. Se detectaron partículas vacías de aproximadamente 25 nm de diámetro (figura 12 a), tamaño reportado para VAA; sin embargo, resultó sumamente difícil identificar las partículas debido al exceso de proteína no viral depositada en la superficie de la rejilla, que en la mayoría de los casos interfirió con la dispersión del haz de electrones afectando la calidad de las imágenes obtenidas. En las muestras 5BI y 5BII, obtenidas a partir de gradientes de CsCl, se observaron partículas de 25 nm de diámetro (figura 12 b-f), así como agregados de partículas. Es notorio que a diferencia de la muestra de extracto crudo, en las muestras provenientes de gradientes se observan menos agregados amorfos de proteína en la rejilla. Mediante esta técnica se confirmó que el estándar seleccionado para cuantificar proteína VP sí contiene cápsides de VAA, al igual que los extractos derivados de cultivos infectados con BacCap.

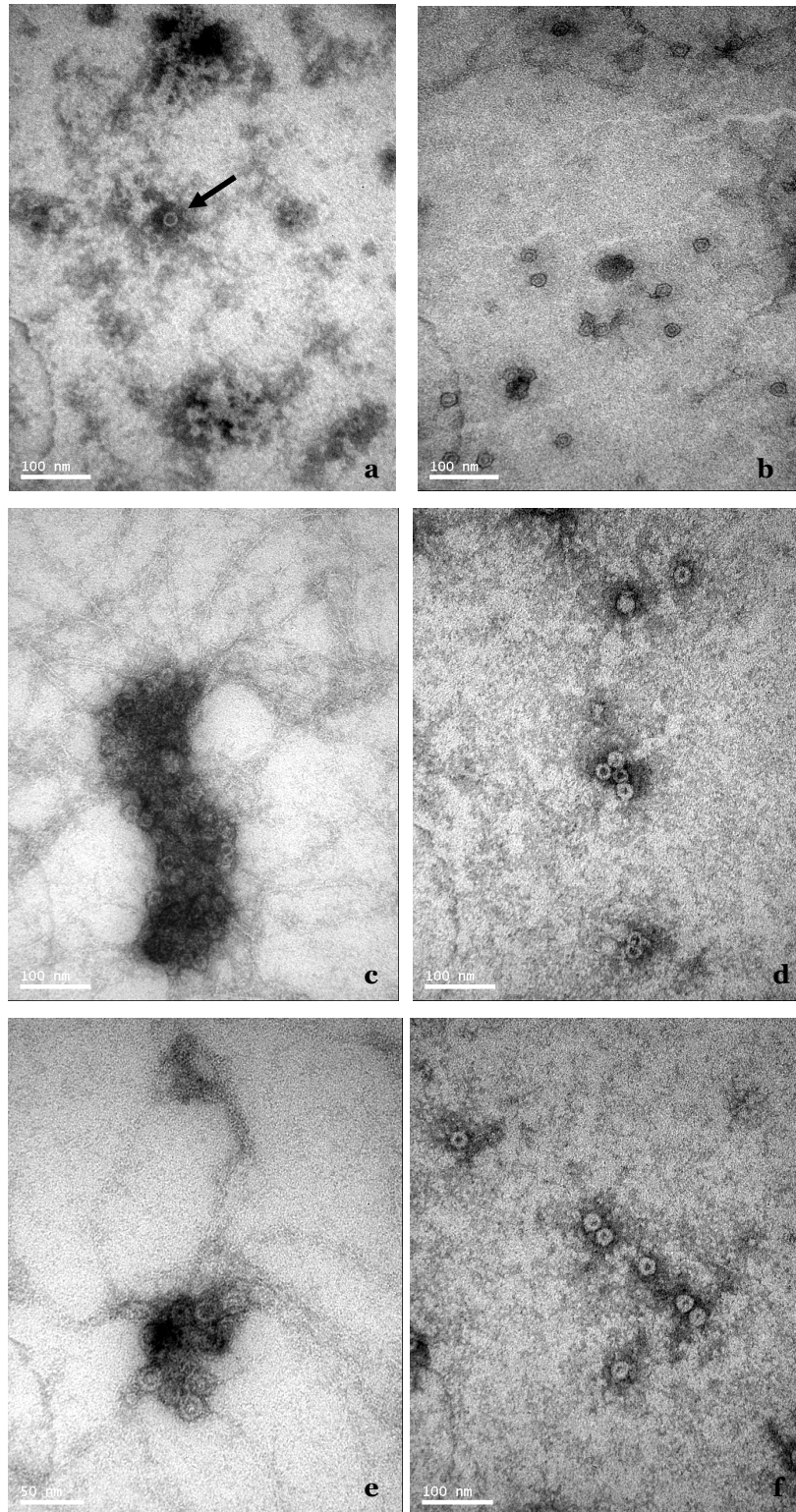


Figura 12. Partículas detectadas por microscopía electrónica usando tinción negativa. (a) Extracto crudo de pellet (140 000 X), la flecha señala una partícula de VAA. (b) Partículas de VAA, muestra 5B I (140 000 X) (c) Agregado de partículas de VAA, muestra 5B I (140 000X). (d y f) Partículas de VAA, muestra 5B II (140 000 X). (e) Agregado de partículas de VAA, muestra 5B I (250 000 X).

Cinética de producción de proteínas estructurales y cápsides de VAA-2

Parámetros cinéticos de los cultivos infectados

Se infectaron células High Five™ con el baculovirus BacCap a MDI de 0.1, 1, 5 y 10 UFP/cél. El stock utilizado corresponde al pase 1 generado tal como se describe en *Producción de stocks virales a partir de placas aisladas*. Se tomaron muestras de 1 mL de cada cultivo a las 0, 18 y 24 horas post infección (hpi); de ahí en adelante el muestreo se realizó cada 24 horas hasta que la viabilidad fue menor a 30%, cuando se cosechó el cultivo. Las muestras se trataron tal como se describe en *Mantenimiento de cultivos celulares y cinéticas de producción de proteínas*. El comportamiento de los cultivos infectados a las diferentes MDI, así como el de un cultivo control sin infectar, se muestra en la figura 13.

El cultivo control alcanzó una concentración celular de 5.5×10^6 cél/mL y se mantuvo la viabilidad arriba del 90% hasta las 96 h del cultivo. A las 120 h la viabilidad cayó drásticamente hasta un valor de 15%. Se ha observado que la caída de viabilidad de cultivos no infectados, tanto para la línea High Five™ como Sf9, está relacionada con el agotamiento de glutamina en el medio de cultivo (Maranga et al., 2003; Ortega-García, 2003). En los cultivos infectados se observó un efecto negativo de la MDI sobre la concentración celular y la viabilidad (figuras 13 a y b). Todos los cultivos infectados disminuyeron su viabilidad después de las 24 hpi, siendo más drástica esta disminución conforme se empleó una MDI mayor. Es de destacar que la infección a bajas MDI con BacCap resultó en una rápida disminución de la viabilidad celular en comparación con el efecto causado por otros baculovirus, tales como BacGFPVP2 y BacVP6 que expresan las proteínas GFP-VP2 y VP6 de rotavirus respectivamente (Mena, 2004). Este efecto de BacCap sobre la viabilidad celular también ha sido observado por Aucoin et al., (2006) para diferentes MDI. Se desconoce si este efecto negativo sobre la viabilidad resulta de un efecto citotóxico de las proteínas VP, tal como se ha reportado para las proteínas Rep de VAA (Schmidt et al., 2000).

Después de la adición de virus, las células no infectadas continúan reproduciéndose mientras las infectadas detienen su crecimiento. La población celular infectada y viable es la responsable de producir la proteína recombinante. En esta cinética se observó que la viabilidad de todos los cultivos fue mayor al 90% hasta las 24 hpi, pero a partir de las 48 hpi tanto la viabilidad como la concentración celular viable (X_v) disminuyeron considerablemente a MDI de 1, 5 y 10 UFP/cél mientras que la concentración celular total se mantuvo prácticamente constante. Por tanto se esperaría que la producción de proteína después de las 48 hpi fuera muy baja para estas MDI.

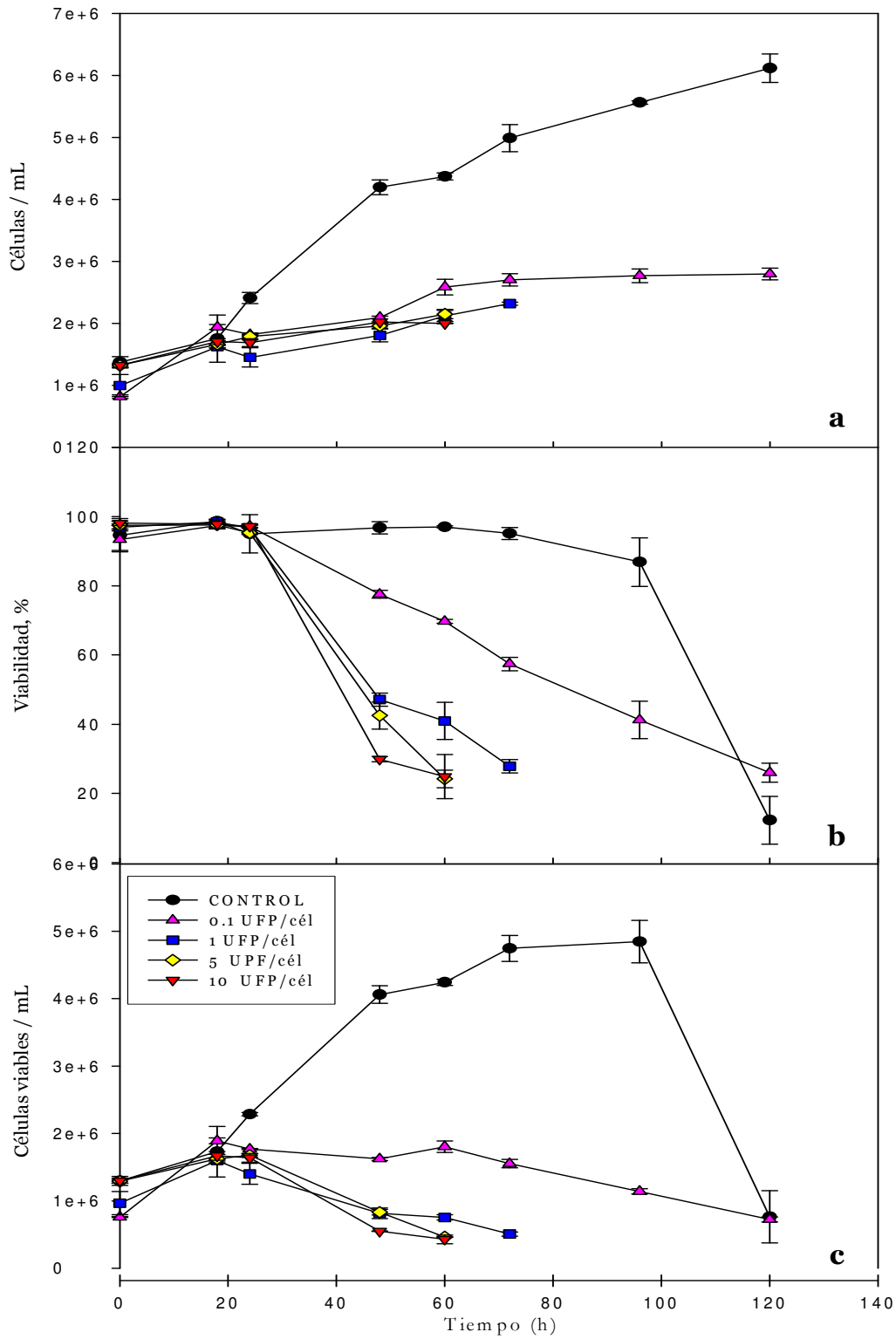


Figura 13. Evolución de la concentración celular (a), del porcentaje de viabilidad (b) y de la concentración celular viable (c) en cultivos infectados con BacCap y en cultivo control. Todos los datos corresponden al promedio de cultivos por duplicado. Las barras representan la diferencia entre ambos experimentos.

En la figura 13 c se observa que en los cultivos infectados a MDI de 0.1 y 1 UFP/cél, la Xv se incrementó casi 250 y 166% respectivamente, durante las primeras 18 hpi. Para el mismo período de tiempo, en los cultivos infectados a 10 y 5 UFP/cél la Xv se incrementó 125 y 128%, respectivamente. Esto indica que a las dos MDI mayores el porcentaje de la población infectada durante las primeras 18 hpi fue mayor que para las MDI de 1 y 0.1 UFP/cél, tal como se predice utilizando la distribución de Poisson.

Proteína total

La proteína total producida en un cultivo no infectado está conformada únicamente por la proteína celular; mientras que en un cultivo infectado ésta se conforma por la proteína celular, la proteína del baculovirus y la proteína recombinante de interés. En este estudio se analizó la producción de proteína total tanto en cultivos infectados como no infectados con el objeto de observar el efecto de la MDI de BacCap sobre la producción de proteína en células High Five™.

La concentración de proteína total en el cultivo control aumentó aproximadamente 17 veces con respecto a la concentración inicial, mientras que en los cultivos infectados este aumento fue mucho menor, incrementándose casi 6 veces a MDI de 0.1 UFP/cél, y 4 veces a MDI de 1, 5 y 10 UFP/cél (figura 14 a). Puesto que la producción de proteína depende de la concentración celular viable (Xv) es importante señalar que la Xv del cultivo control llegó a ser aproximadamente 3 veces mayor que cuando se infectó a MDI de 0.1 UFP/cél; por su parte la Xv a MDI de 0.1 UFP/cél, a partir de las 48 hpi, fue aproximadamente 2.5 veces mayor que a MDI de 1 UFP/cél y 4 veces mayor que a MDI de 5 y 10 UFP/cél. En los cultivos infectados la Xv se mantuvo casi constante por un período de tiempo más prolongado al infectar a MDI de 0.1 UFP/cél, en comparación con las otras MDI, prolongando así el período de producción de proteína.

La concentración de proteína en pellet fue significativamente mayor en el cultivo control que en los cultivos infectados (figura 14 b), donde la concentración menor se obtuvo a la MDI de 10 UFP/cél. Se observó que conforme aumentó la MDI también aumentó la concentración de proteína en sobrenadante a tiempos tempranos de infección (figura 14 c). Esto debido al daño y muerte celular provocados por la infección. A partir de las 48 hpi, la proteína de sobrenadante representó el 70% del total a MDI de 0.1 y 1 UFP/cél, y un 80% en las MDI mayores. En el cultivo control la proteína en sobrenadante representó un 10 – 20 % del total hasta las 96 h de cultivo, y se incrementó al 90% después de la caída de la viabilidad celular.

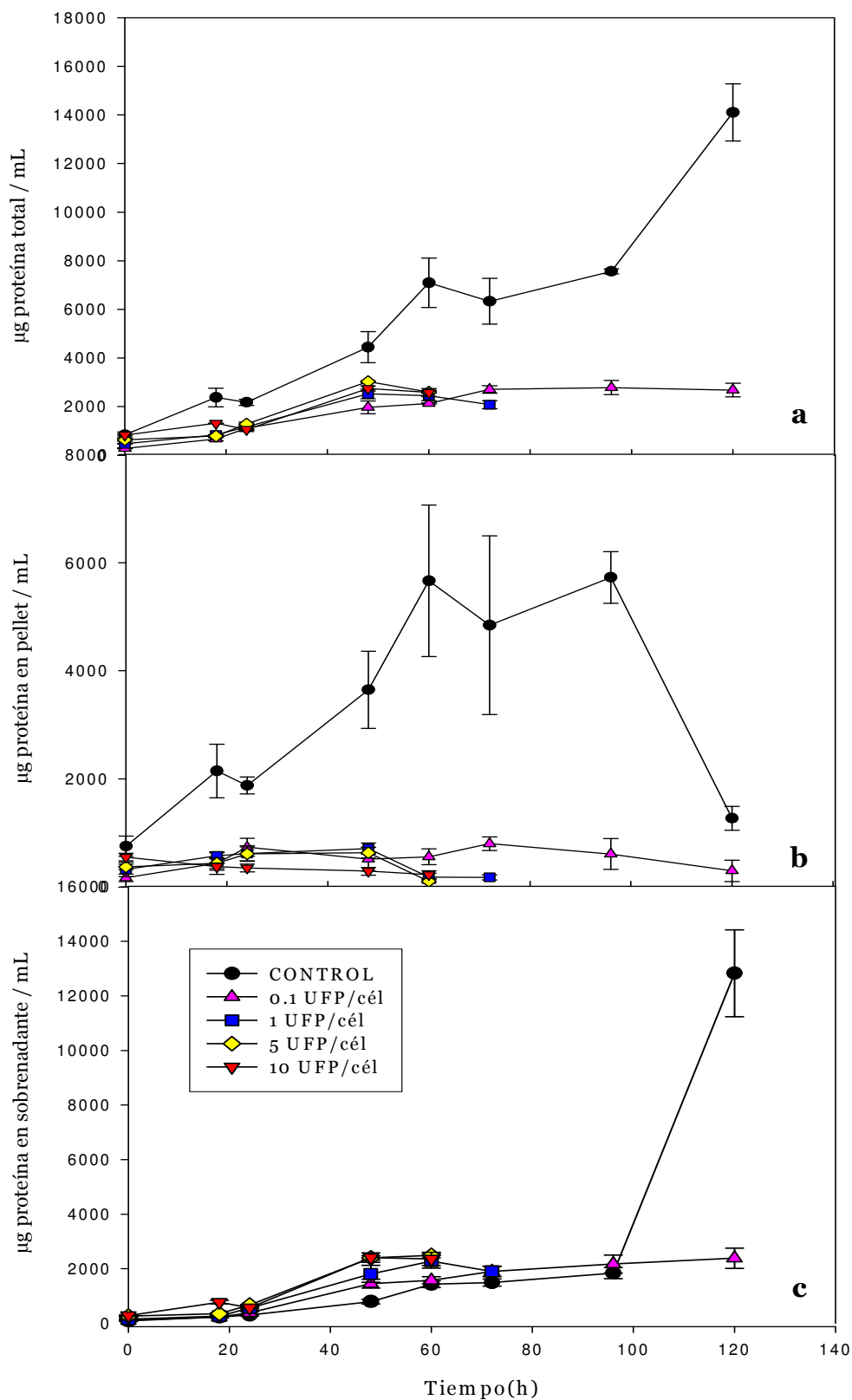


Figura 14. Concentración de proteína total (a), proteína en pellet (b) y proteína en sobrenadante (c) en cultivos infectados con BacCap y en cultivo control. Todos los datos corresponden al promedio de cultivos por duplicado. Las barras representan la diferencia entre ambos experimentos.

El rendimiento de proteína total en cultivos infectados a MDI de 1, 5 y 10 UFP/cél se duplicó de las 24 a las 48 hpi (tabla 8). Este intervalo de tiempo coincide con la caída de viabilidad del cultivo; sin embargo, el hecho de que la concentración celular fuera constante en este mismo período indica que el incremento en el rendimiento de proteína se debe al aumento en la síntesis de proteína por efecto de la infección. Al caer Xv a las 48 hpi la producción de proteína se detuvo prácticamente, esto provocó que el rendimiento no aumentara más de las 48 a las 60 hpi. En cultivos infectados a MDI de 0.1 UFP/cél, el rendimiento se duplicó de las 24 a las 72 hpi, y se mantuvo prácticamente constante hasta el final del cultivo. Kamen et al. (1995) reportaron también una duplicación en los rendimientos de cultivos después de la infección. De las 18 a las 24 h, el rendimiento de proteína en el cultivo control fue mayor que el de los cultivos infectados, pero a partir de las 48 hpi el rendimiento del control fue igual al de los cultivos infectados. De esto se podría inferir que la maquinaria celular en los cultivos infectados se encontró trabajando al mismo nivel que la maquinaria de las células sanas en fase exponencial de los cultivos no infectados, a diferencia de que la maquinaria fue desviada hacia la producción de proteína de baculovirus y recombinante en lugar de ser utilizada para la síntesis de proteína celular.

Tabla 8. Rendimiento de proteína total (μg de Proteína total / cél)

TIEMPO	μg de Proteína total / cél									
	CONTROL		MDI 0.1		MDI 1		MDI 5		MDI 10	
0	6.1E-04	4.5E-05	3.5E-04	7.6E-06	5.0E-04	9.5E-05	4.8E-04	5.0E-05	6.3E-04	4.9E-05
18	1.3E-03	3.4E-04	3.5E-04	3.1E-05	5.2E-04	1.4E-06	4.8E-04	1.9E-05	7.7E-04	2.3E-05
24	9.0E-04	2.0E-05	6.1E-04	7.4E-05	8.1E-04	8.8E-06	7.2E-04	2.2E-05	6.3E-04	6.8E-06
48	1.1E-03	1.2E-04	9.4E-04	1.4E-04	1.4E-03	1.9E-04	1.5E-03	4.8E-05	1.4E-03	4.5E-05
60	1.6E-03	2.5E-04	8.3E-04	5.0E-05	1.2E-03	1.5E-04	1.2E-03	6.1E-05	1.3E-03	7.9E-05
72	1.3E-03	2.5E-04	1.0E-03	2.1E-05	9.0E-04	6.0E-05				
96	1.4E-03	2.6E-05	1.0E-03	6.4E-05						
120	2.3E-03	1.1E-04	9.6E-04	1.3E-04						

Análisis de proteínas estructurales de VAA-2

Se cuantificó proteína VP con el objeto de estudiar la capacidad de producción de proteína VP de células High Five™, así como para estimar los rendimientos de ensamblaje y conocer si éstos se ven modificados empleando distintas MDI. Urabe et al. (2002) afirman que en este sistema de expresión las proteínas VP se producen en una relación estequiométrica igual a la observada en cápsides de VAA silvestre basándose en la estequiometría de cápsides purificadas; sin embargo, otros reportes argumentan que la expresión de las VP difiere de la relación 1:1:10 (VP1:VP2:VP3) lo que puede favorecer la producción de partículas con estequiometría distinta de la del virus silvestre (Kohlbrenner et al., 2005). Sin embargo, estos reportes se basan en análisis densitométricos no cuantitativos de inmunoblots y no cuantifican proteína VP total producida.

Este es el primer reporte cuantitativo de producción de proteína VP de VAA-2 tanto para un sistema recombinante como para sistemas con el virus silvestre. El análisis de proteína VP se realizó como se describe en *Análisis de expresión de proteínas (Materiales y Métodos)*. Como controles negativos se utilizaron muestras de cultivos sin infectar para cada tiempo de muestreo, así como una muestra de cultivo infectado con BacRep y otra de un cultivo infectado con BacGFP. Ningún control negativo reaccionó con B1 y A69. Nuevamente se observó degradación de proteína VP con ambos anticuerpos. Cabe mencionar que durante este estudio no se usaron inhibidores de proteasas tal como se sugiere utilizar para cultivos con estas células (Martensen y Justensen, 2000), con el fin de simular cultivos a gran escala, donde el uso de estos inhibidores se ve limitado por su alto costo. En la figura 15 se muestran algunas de las muestras analizadas.

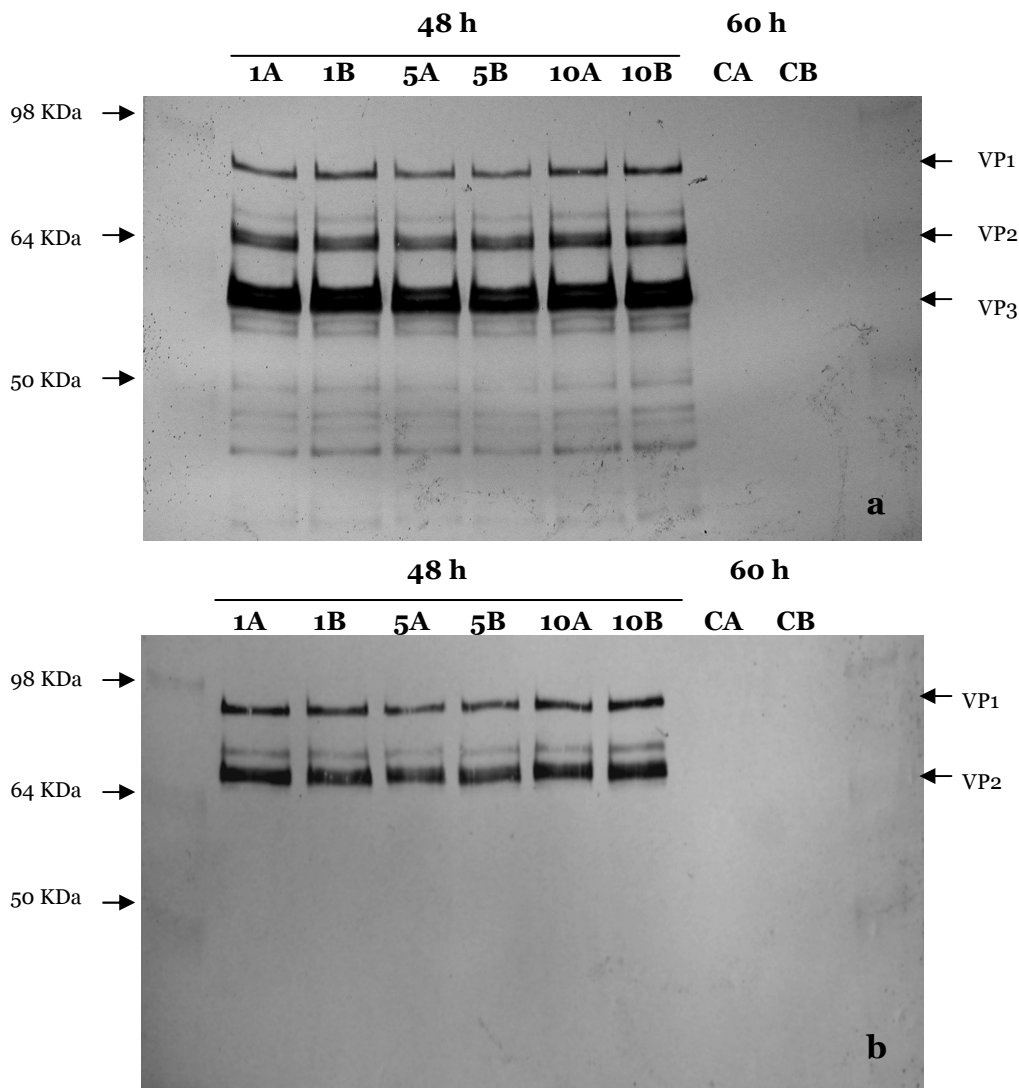


Figura 15. Western blot de proteína VP en muestras de extracto de pellet utilizando los anticuerpos B1(a) y A69 (b). Marcador de PM: See Blue Plus (Invitrogen). Carriles 2-7: muestras de cultivos infectados correspondientes a las 48 hpi; el número indica la MDI, la letra indica la réplica del experimento. Carriles 8-9: muestras de cultivos control. El gel se dejó correr hasta que la banda de 36 KDa saliera del gel.

Utilizando las ecuaciones obtenidas en las curvas estándar se calcularon los moles de cada VP a los diferentes tiempos post-infección; al dividir entre el volumen de muestra empleado para el análisis se obtuvo la concentración de cada VP en moles/mL. Para las 3 proteínas VP se observó que la MDI que produjo mayores rendimientos fue la de 0.1 UFP/cél (figura 16).

Producción de VP3

La concentración máxima de proteína VP3 fue de 99.3 ± 8.8 $\mu\text{g/mL}$ que equivalen a 1.63 ± 0.14 nmoles/mL, y se alcanzó a las 120 hpi utilizando la MDI de 0.1 UFP/cél. En cultivos infectados a MDI de 1, 5 y 10 UFP/cél se detectó VP3 en pellet a partir de las 24 hpi, representando un 60% de la VP3 total a MDI de 1 y 5 UFP/cél, y un 20% del total a MDI de 10 UFP/cél. A las 48 hpi la concentración total de VP3 se incrementó 9, 3 y 12 veces para las MDI de 1, 5 y 10 UFP/cél, respectivamente con respecto a las 24 hpi. A las 48 hpi la concentración de VP3 a MDI de 0.1 UFP/cél fue prácticamente igual a la concentración de VP3 a 1 UFP/cél, sin embargo la proteína de pellet correspondió a casi el 70% a MDI de 0.1 y el 50% a MDI de 1 UFP/cél. La concentración de VP3 en pellet a MDI de 0.1 UFP/cél se mantuvo casi constante de las 48 a las 96 hpi, después de este período se incrementó 2.7 veces (figura 16 a). Se reporta que para otros virus de la familia *Parvoviridae* los genes *cap* codifican únicamente para VP1 y VP2, y que VP3 se genera a partir de la proteólisis de VP2 (Berns, 1990; Berns 1996). Para VAA no existen reportes que señalen al proceso de proteólisis de VP1 ó VP2 como fuente de producción de VP3, no obstante en este estudio se observó un incremento en la concentración de VP3 después de las 96 hpi que coincide con una disminución de proteína VP2.

En los cultivos infectados a MDI 5 y 10 UFP/cél se detectó VP3 en sobrenadante a partir de las 18 hpi. Esto se puede relacionar con la muerte celular a causa de la infección, provocada por el secuestro de la maquinaria celular por el virus que inhibe casi por completo los procesos celulares impidiendo que la célula regenere su maquinaria enzimática y lleve a cabo procesos de mantenimiento y reparación celular (Miller, 1996). Esto ocurriría en todas las células infectadas, independientemente de la MDI, pero el número de copias del gen recombinante en una célula depende del número de virus que la infectaron inicialmente, y por tanto se produce mayor o menor cantidad de proteína recombinante que se libera al medio de cultivo durante la lisis. En estos cultivos observamos que al aumentar el tiempo de cultivo aumentó considerablemente el porcentaje de VP3 en sobrenadante para cultivos infectados a MDI de 1, 5 y 10 UFP/cél.

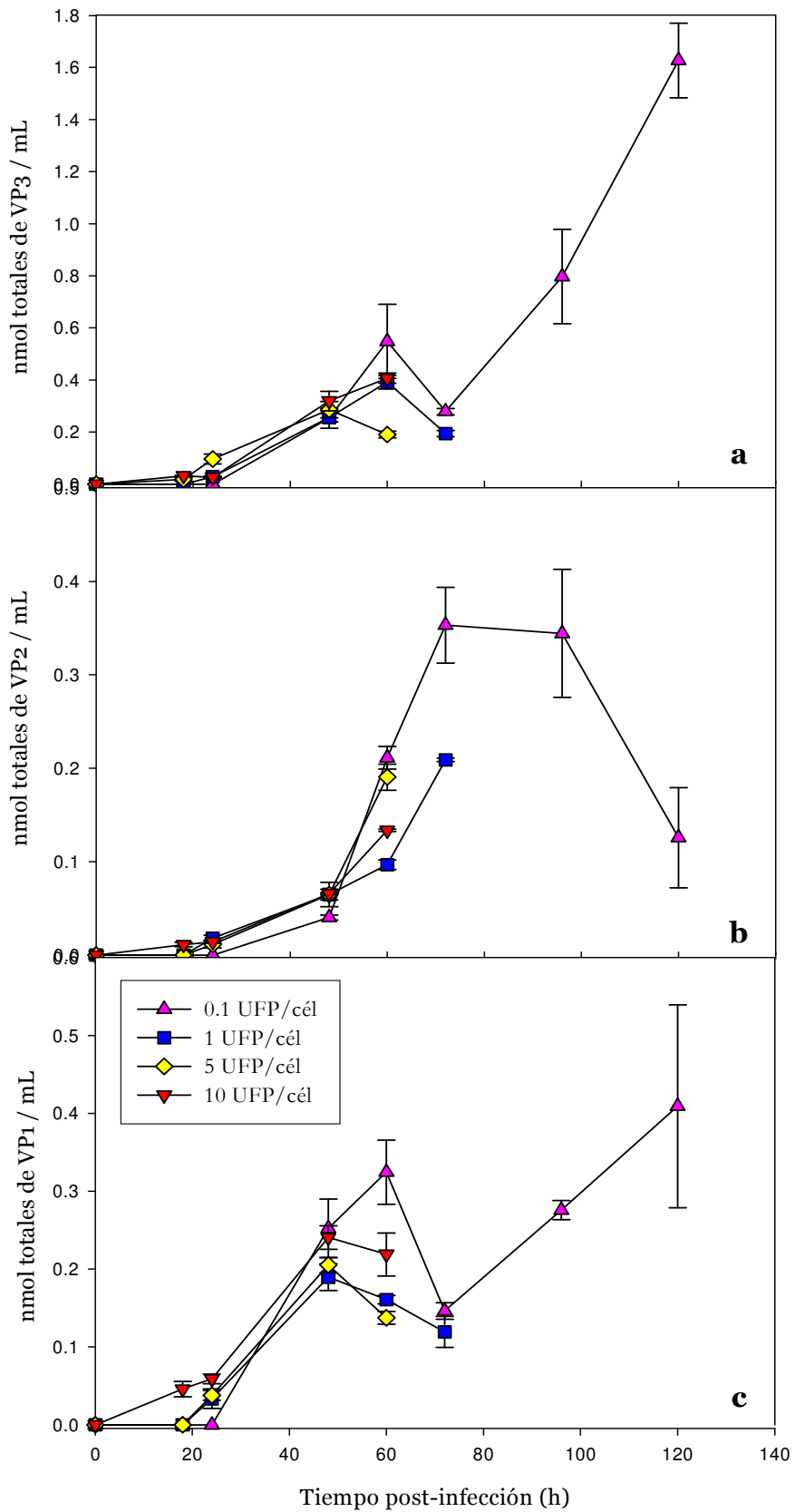


Figura 16. Producción total de proteínas VP3 (a), VP2 (b) y VP1 (c). Todos los datos corresponden al promedio de cultivos por duplicado. Las barras representan la diferencia entre ambos experimentos.

Es importante señalar que a MDI de 0.1 UFP/cél, a las 120 hpi el 90% de VP3 se detectó en pellet. Esto coincide con otros trabajos que reportan que prácticamente toda la proteína ensamblada se acumula en la fracción del pellet (Meghrouh et al., 2005; Aucoin et al., 2006), esto debido a la formación y acumulación de cápsides en el núcleo de la célula (Hunter y Smulski, 1992; Wistuba et al., 1997). Por tanto se esperaría que VP3 se mantenga intracelular después de la lisis celular debido a la formación de cápsides virales. Usando la MDI de 0.1 UFP/cél se produjo aproximadamente 8 veces más VP3 que a MDI de 1 y 5 UFP/cél; y 4 veces más que a MDI de 10 UFP/cél. Esto sugiere que se debiera obtener un mayor rendimiento de partículas ensambladas a la MDI menor, puesto que VP3 es la proteína más abundante de la cápside, y por tanto su concentración podría representar una limitante para el ensamblaje.

Considerando que la expresión de proteína VP se encuentra bajo el control del promotor tardío *polh*, el cual se mantiene activo en un período de 18-120 hpi, la severa caída de viabilidad a partir de las 48 hpi en los cultivos infectados a MDI de 5 y 10 UFP/cél resulta en una disminución de los rendimientos de proteína que podrían alcanzarse con este promotor.

La proteína VP3 requiere de la coexpresión de las VP de mayor PM para ser transportada al núcleo ya que carece de la secuencia señal de transporte nuclear incluida en VP1 y VP2 (Hoque et al., 1999), sin embargo posee la información necesaria para el ensamblaje, aún en ausencia de las otras VP (Hoque et al., 1999; Warrington et al., 2004). Al expresar únicamente VP3 en células de mamífero se ha observado que tiende a formar agregados en el citoplasma (Ruffing et al., 1992), sin embargo VP3 no se ensambla en cápsides cuando es expresada sola o en ausencia de señales de localización nuclear (Ruffing et al., 1992; Hoque et al., 1999). Resultaría de gran interés observar la interacción de VP3 con las demás proteínas virales en el SCI-BV para determinar el sitio de acumulación de la proteína más abundante de las cápsides de VAA.

Producción de VP2

Una de las funciones de VP2 es transportar a VP3 al núcleo (Hoque et al., 1999), lugar donde se forman las cápsides; sin embargo se desconoce la concentración a la cual deba encontrarse presente para favorecer el ensamblaje de VAA en el SCI-BV. Se sabe que la modificación de secuencias que permiten el reconocimiento de receptores celulares contenidas en VP2, o incluso la inserción de péptidos de hasta 30 KDa de longitud (Warrington et al., 2004) ha permitido modificar el tropismo de las partículas generadas, sin afectar su capacidad de ensamblaje, y dirigirlas específicamente a distintas células blanco (Grimm et al., 2003).

La concentración máxima de proteína VP2 producida fue de $26.1 \pm 3.0 \mu\text{g/mL}$, que equivalen a $0.35 \pm 0.04 \text{ nmoles/mL}$, y se alcanzó de las 72 a las 96 hpi utilizando la MDI de 0.1 UFP/cél. Se detectó VP2 a partir de las 48 hpi en pellet y sobrenadante en cultivos infectados a MDI de 0.1 UFP/cél, mientras que a MDI de 1, 5 y 10 UFP/cél se detectó a partir de las 24 hpi, tanto en pellet como en sobrenadante. A MDI de 0.1 UFP/cél la proteína VP2 de pellet constituyó cerca del 40% del total. Sin embargo, para las MDI de 1, 5 y 10 UFP/cél la proteína VP2 de sobrenadante representó cerca del 90%.

A MDI de 0.1 UFP/cél la concentración de VP2 disminuyó 2.7 veces después de las 96 hpi (figura 16 b). En los Western blots realizados con A69 no se apreció un incremento en las bandas de degradación proteolítica de PM entre 36 y 50 KDa, pero es en este tiempo donde se observó un aumento en la concentración de VP3. Es posible que éste se deba en parte a la producción de fragmentos de PM cercano a 64 KDa producidos durante la degradación de VP2. Van Vliet et al. (2006) reportan que la digestión de proteína VP de VAA-2 con tripsina produce un fragmento de 74 KDa (PM correspondiente a VP2) como producto de la digestión de VP1; y otro de PM ligeramente menor al de VP3 a partir de la digestión de VP1 y VP2; se producen además tres fragmentos de aproximadamente 47 KDa, 17.5 KDa y 15 KDa a partir de la digestión de las 3 VP. En el reporte mencionado sólo el fragmento de 15 KDa fue reconocido por el anticuerpo B1. En estas cinéticas se observaron múltiples bandas de degradación y no podría descartarse que así como se generan fragmentos de PM similar al de VP2 a partir de la digestión de VP1 también se generen fragmentos de PM similar al de VP3 a partir de la proteólisis de la VP1 y VP2.

Producción de VP1

La concentración máxima de proteína VP1 producida fue de $34.0 \pm 1.1 \mu\text{g/mL}$, que equivalen a $0.41 \pm 0.13 \text{ nmoles/mL}$, y se alcanzó a las 120 hpi utilizando la MDI de 0.1 UFP/cél. La producción de VP1 fue menor a MDI de 1 y 5 UFP/cél, mientras que a MDI de 0.1 y 10 UFP/cél se produjo prácticamente la misma cantidad (figura 16 c). En cultivos infectados con MDI de 1 y 5 UFP/cél se observó VP1 a partir de las 24 hpi, tanto en pellet como en sobrenadante, mientras que a MDI de 10 UFP/cél se pudo detectar desde las 18 hpi. Esta proteína fue detectada en el cultivo a MDI de 0.1 UFP/cél a partir de las 48 hpi y la concentración se mantuvo prácticamente constante hasta las 120 hpi. Al igual que VP2, VP1 se localizó principalmente en sobrenadante, representando cerca del 70-80% del total producido.

La proteína VP1 posee en su extremo amino-terminal un dominio con actividad fosfolipasa A2 (PLA2) el cual es indispensable durante el proceso de tráfico del virus a través de la célula

huésped. Se cree que la actividad PLA2 de VP1 contribuye a que VAA sea liberado del endosoma para posteriormente iniciar el tráfico al interior del núcleo y producir una transducción eficiente (Girod et al., 2002; Ding et al., 2005). Si a causa de la proteólisis se afecta el dominio PLA2 de VP1 antes o después del ensamblaje se obtendrán bajos rendimientos de partículas transductoras sin importar cuales sean los rendimientos de ensamblaje o encapsidación de genomas. A lo largo del desarrollo de estas cinéticas se observó degradación de proteína VP1.

Nuevamente, resulta importante recalcar que estos son los primeros reportes sobre producción de proteína VP y que la concentración observada es mucho mayor que la alcanzada para otras proteínas tales como GFP-VP2 de rotavirus donde la mayor concentración alcanzada fue de $1.19 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ (Mena, 2004).

Relación estequiométrica de proteínas VP

La relación estequiométrica para cada MDI se calculó tomando el valor máximo de VP3 total (en pellet y sobrenadante) y los valores de VP1 y VP2 para ese tiempo. Como se puede observar en la figura 17, la relación molar para VP1:VP2:VP3 difiere de la reportada para partículas ensambladas de VAA-2 (1:1:10) (Rose et al., 1971). En esta sección se reporta proteína analizada en condiciones desnaturalizantes, que puede o no estar ensamblada. Desafortunadamente, por medio de ultra-centrifugación usando gradientes de CsCl, no fue posible obtener cápsides puras para definir la estequiometría de las mismas.

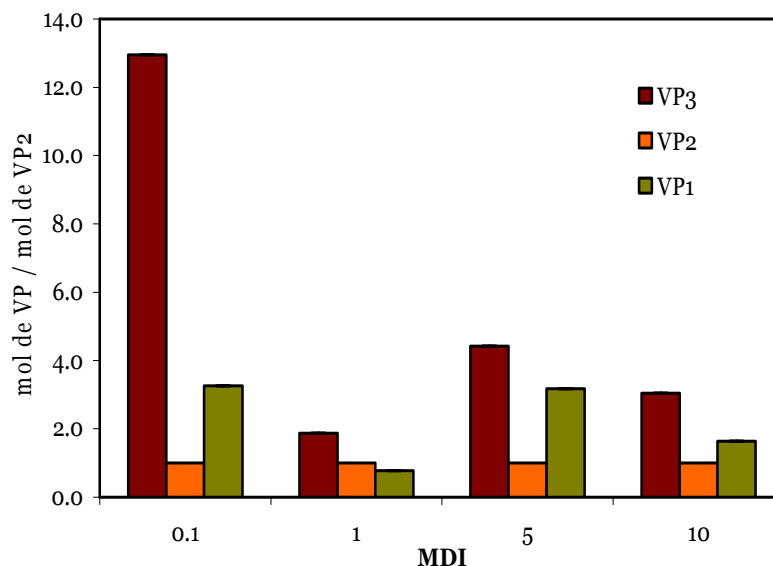


Figura 17. Relación estequiométrica de VP's a la concentración máxima total de VP3. MDI 0.1 UFP/mL (120 hpi), MDI 1, 5 y 10 UFP/mL (60 hpi). Todos los datos corresponden al promedio de cultivos por duplicado.

La estequiometría entre las 3 proteínas VP varió a las distintas MDI. En este estudio se esperaba observar una relación estequiométrica entre VP1, VP2 y VP3 constante a las diferentes MDI probadas puesto que BacCap contiene en un solo casete de expresión las secuencias codificantes para las 3 proteínas VP, y que la MDI influyera principalmente en los rendimientos de proteína VP total y por ende, también de VP ensamblada, tal como ocurre en la producción de otras PPV (Palomares y Ramírez, 2001; Maranga et al., 2003). La estequiometría observada para la MDI de 0.1 UFP/cél (120 hpi) fue la más cercana a la reportada en la literatura (figura 17).

El hecho de que exista proteína VP2 y VP1 en una proporción mayor a la requerida para la formación de cápsides podría implicar la formación de otras pseudo-partículas de VAA conformadas únicamente por la proteína VP2 o por VP1 y VP2 tal como reportan Ruffing et al. (1992). Es posible que modificaciones en el casete de expresión del baculovirus BacCap que disminuyan los niveles de expresión de VP1 y VP2 reduzcan la sobrecarga metabólica y con ello el daño celular observado con BacCap. Sin embargo, puesto que VP3 depende de la presencia de VP1 y VP2 para ser transportada al núcleo celular, lugar donde se lleva a cabo el ensamblaje de las cápsides (Wistuba et al., 1995; Wistuba et al., 1997; Hoque et al., 1999), es posible que en las células de insecto se requiera también de un exceso de estas proteínas para llevar a cabo el transporte de VP3 eficientemente. Es por ello que aún resulta necesario realizar ensayos de inmunodetección de las proteínas VP *in situ* para observar su distribución intracelular y su interacción con el fin de diseñar estrategias que favorezcan su producción y su ensamblaje.

Cuantificación de cápsides de VAA-2

Inicialmente se consideró la posibilidad de cuantificar cápsides ensambladas de VAA-2 mediante un ensayo de ELISA utilizando el kit comercial de PROGEN Biotechnik. Este kit utiliza el anticuerpo monoclonal A20; el cual reconoce un epítipo presente sólo en proteínas VP ensambladas con o sin material genético incorporado a ellas (Grimm et al., 1999; Wobus et al., 2000). Wistuba et al. (1997) reportaron que A20 es capaz de reconocer pseudo-partículas de VP2/VP3 al igual que lo hace con el virus silvestre, pero no es capaz de unirse a proteína VP no ensamblada. El uso de anticuerpos para cuantificar macroestructuras puede sobre-estimar su concentración real debido al reconocimiento de estos anticuerpos por los bloques (polímeros de proteína) que conforman la macroestructura pero que no necesariamente conforman una cápside completa. Esto se confirmó a través de inmunoblots de partículas ensambladas usando A20, donde se identificaron, por reacción positiva con el anticuerpo, bandas de diferentes tamaños de partículas (gel no mostrado) y por tanto se optó por no utilizar este método de

cuantificación. Otro método reportado para cuantificar cápsides de VAA está basado en la absorbancia de las partículas a 260 y 280 nm (Sommer et al., 2003); este método es útil sólo en preparaciones de virus de alta pureza (arriba del 99%) donde no existe interferencia en la absorbancia por presencia de otras proteínas, por lo que no resulta un método factible para el monitoreo durante procesos. Un tercer método de cuantificación utiliza PCR-cuantitativo para determinar el número de cápsides de VAA-2 que contienen material genético (Rohr et al., 2005). Este método no permite cuantificar el número de cápsides vacías. Hasta hoy no existen reportes acerca de un método de cuantificación que permita diferenciar las cápsides completas de VAA (con o sin material genético) de los polímeros de proteína VP, en muestras sin purificar obtenidas directamente de procesos, lo cual representa una necesidad evidente.

Recientemente, se han desarrollado métodos de cuantificación de pseudo-partículas del antígeno de superficie de Hepatitis B (AsHB) con diámetro de 20-27 nm (Fabián-Macedo, 2007) y pseudo-partículas de rotavirus utilizando HPLC de exclusión en gel (Mena et al., 2005), donde ha sido posible separar baculovirus de la partícula VP2/VP6 de 69 nm de diámetro, además de discriminar estas macroestructuras del resto de la proteína de extractos celulares. Con base en esto consideramos factible implementar un método de cuantificación de cápsides de VAA usando cromatografía de exclusión en gel.

HPLC de exclusión en gel

La cromatografía de exclusión molecular se basa en la separación de partículas con base en su tamaño por una matriz de tamaño de poro definido. Las partículas de tamaño menor al poro de la matriz penetran en ella y recorren un camino cuya longitud depende de su tamaño. Las partículas cuyo diámetro excede el tamaño de poro de la matriz son excluidas de la misma.

Primeramente se caracterizó el perfil cromatográfico de partículas de VAA-2 de origen comercial (PROGEN Biotechnik, Alemania) y de las partículas de VAA-2 purificadas mediante ultracentrifugación con gradientes de CsCl, mismas que se utilizaron como estándares de proteína VP (figura 18). Esta caracterización tuvo como objetivo determinar los tiempos de elusión de las partículas de VAA para establecer el intervalo de recolección de las fracciones de elusión en las muestras problema. La señal de absorbancia en 3 los estándares analizados inició a los 12.5 min y se extendió hasta los 19.8 min aproximadamente. A tiempos de elusión mayores se observaron, incluso en el estándar comercial, muchos más picos que corresponden a partículas de diámetro menor, proteína desensamblada y degradada.

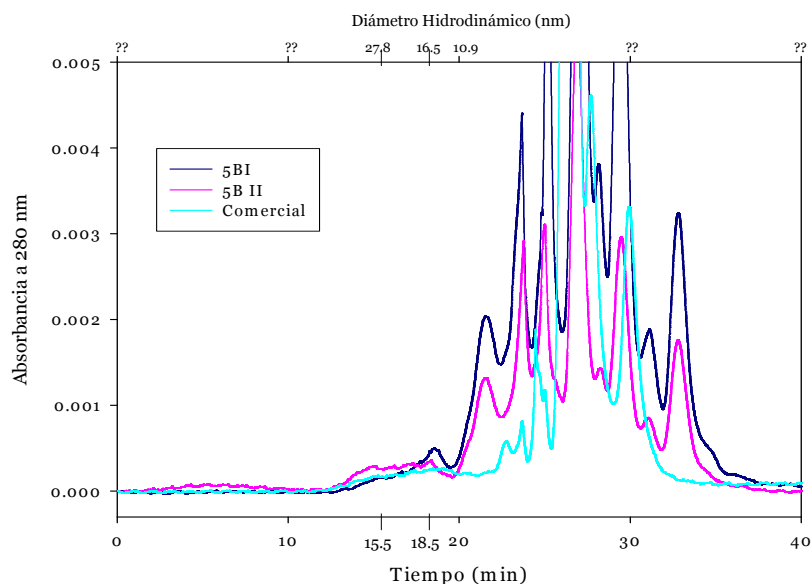


Figura 18. Perfil cromatográfico de cápsidas vacías de VAA usando las columnas Ultrahydrogel 2000 y Ultrahydrogel 500 en serie con pre-columna, usando buffer de fosfatos 10 mM a pH 8. 5B I y 5B II: bandas 1 y 2, respectivamente, colectadas a partir de extractos de pellet sometidos a ultra-centrifugación con gradientes de CsCl. Comercial: preparación comercial de cápsidas de VAA-2 (PROGEN, Biotechnik).

Determinación de tamaño de partícula

El diámetro de las partículas en las fracciones observadas en los perfiles cromatográficos se determinó como se explica en la sección de *Cálculo de tamaño de partícula*. Se analizó el perfil cromatográfico de extractos de pellet tanto de cultivos no infectados como infectados con BacCap a diferentes MDI. En este análisis se incluyeron partículas purificadas de AsHB como estándar de tamaño de partícula ya que poseen un diámetro similar al de VAA-2 (figuras 19 y 20). Todas las muestras de cultivos infectados presentaron el mismo patrón cromatográfico, mientras que en la muestra del cultivo no infectado no se observó señal de absorbancia en las fracciones señaladas en las figuras 19 b y 20 b.

La partícula de AsHB presentó un pico a los 15.7 min y un hombro con tiempo de elusión de 16.3 min que corresponden a partículas de 27 y 24.9 nm respectivamente, con lo cual se corroboró que el sistema trabajó bajo las mismas condiciones reportadas por Fabián-Macedo (2007) y por tanto es válido utilizar la curva de calibración reportada por él. Para las fracciones Fo y F1 (figuras 19 b y 20 b) con tiempos de elusión de 13 y 15 min, respectivamente, no fue posible calcular un tamaño de partícula debido a que estos tiempos están fuera del intervalo de tiempos de elusión manejados en la curva estándar. Mena et al. (2005) reportan que los baculovirus eluyen a los 12.3 min, utilizando el mismo sistema de columnas pero diferente fase móvil, por lo que es posible que la Fo corresponda a baculovirus. Para la F2, con tiempo de elusión de 16.78 min, se obtuvo un diámetro de 23 nm, valor que se encuentra dentro del rango

reportado para VAA-2 (20-25 nm); para la F3, con tiempo de elusión de 18.8 min se calculó un diámetro de 15.4 nm que no podría corresponder a VAA-2.

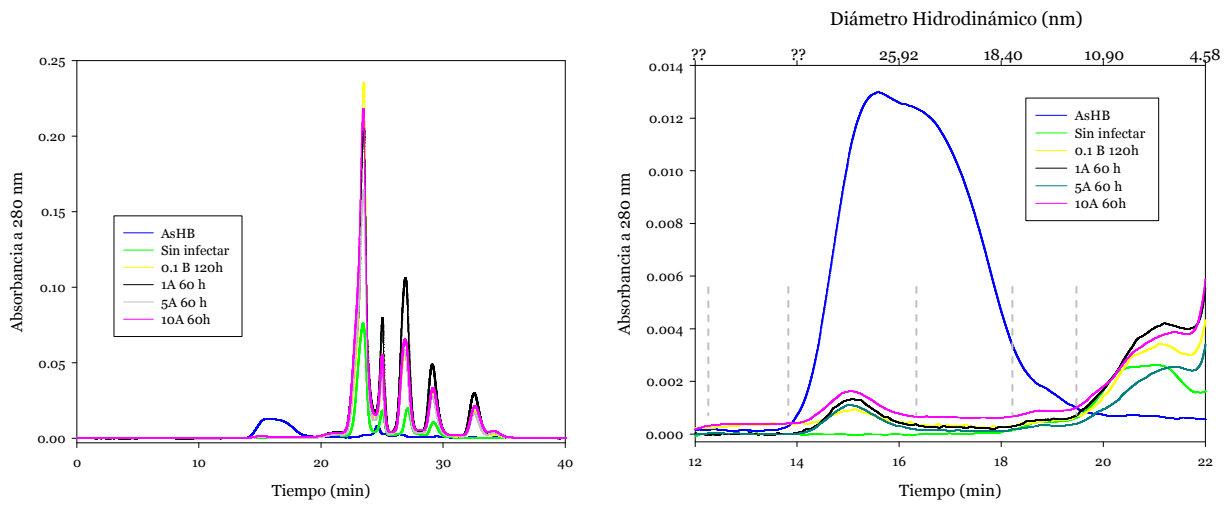


Figura 19. (a) Perfil cromatográfico de absorbancia de muestras de extracto de pellet de cultivos no infectados, cultivos infectados con BacCap a diferentes MDI, y de partículas purificadas del AsHB usando las columnas Ultrahydrogel 2000 y Ultrahydrogel 500 en serie con pre-columna, usando buffer de fosfatos 10 mM a pH 8. (b) Ampliación de figura (a).

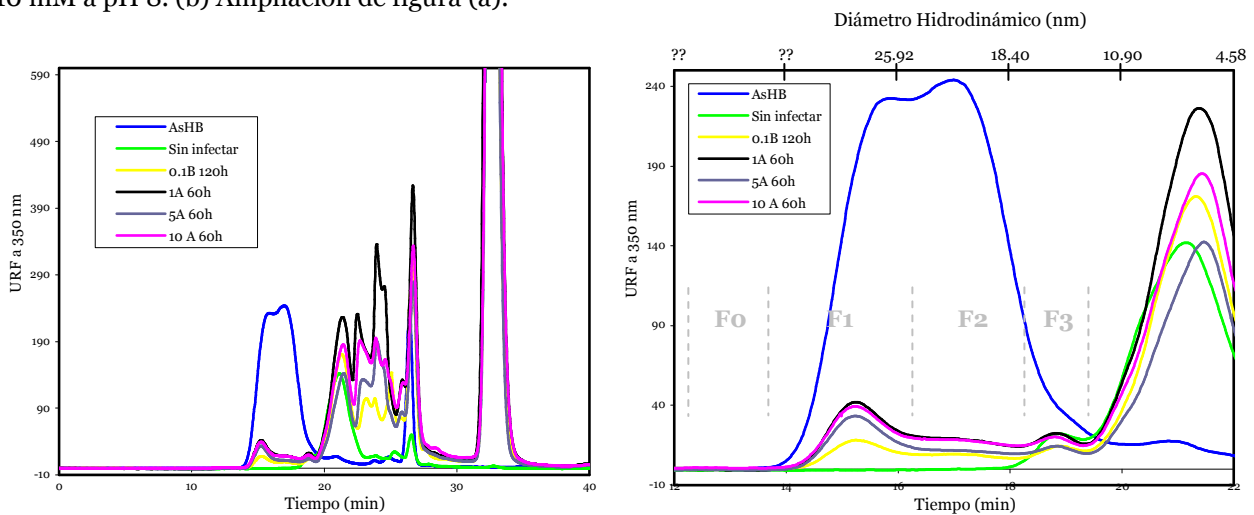


Figura 20. (a) Perfil cromatográfico de fluorescencia de muestras de extracto de pellet de cultivos no infectados, cultivos infectados con BacCap a diferentes MDI, y de partículas purificadas del AsHB usando las columnas Ultrahydrogel 2000 y Ultrahydrogel 500 en serie con pre-columna, usando buffer de fosfatos 10 mM a pH 8. (b) Ampliación de figura (a).

De acuerdo al diámetro, se esperaba obtener partículas ensambladas en el intervalo de elusión de F2 (diámetro de 23 nm), mientras que a tiempos menores migrarían los agregados de partículas presentes en muestras concentradas, como las obtenidas a partir de gradiente de CsCl. Para corroborar la presencia de cápsides de VAA se recolectó el volumen de elusión de cada una de las fracciones señaladas en la figura 19 b. Éstas se analizaron por Western blot (figura 21 a) con los anticuerpos B1 y FastPlax™, Novagen (anti Gp64 de baculovirus). La F0 no se analizó puesto que no se observó señal en todos los cultivos analizados.

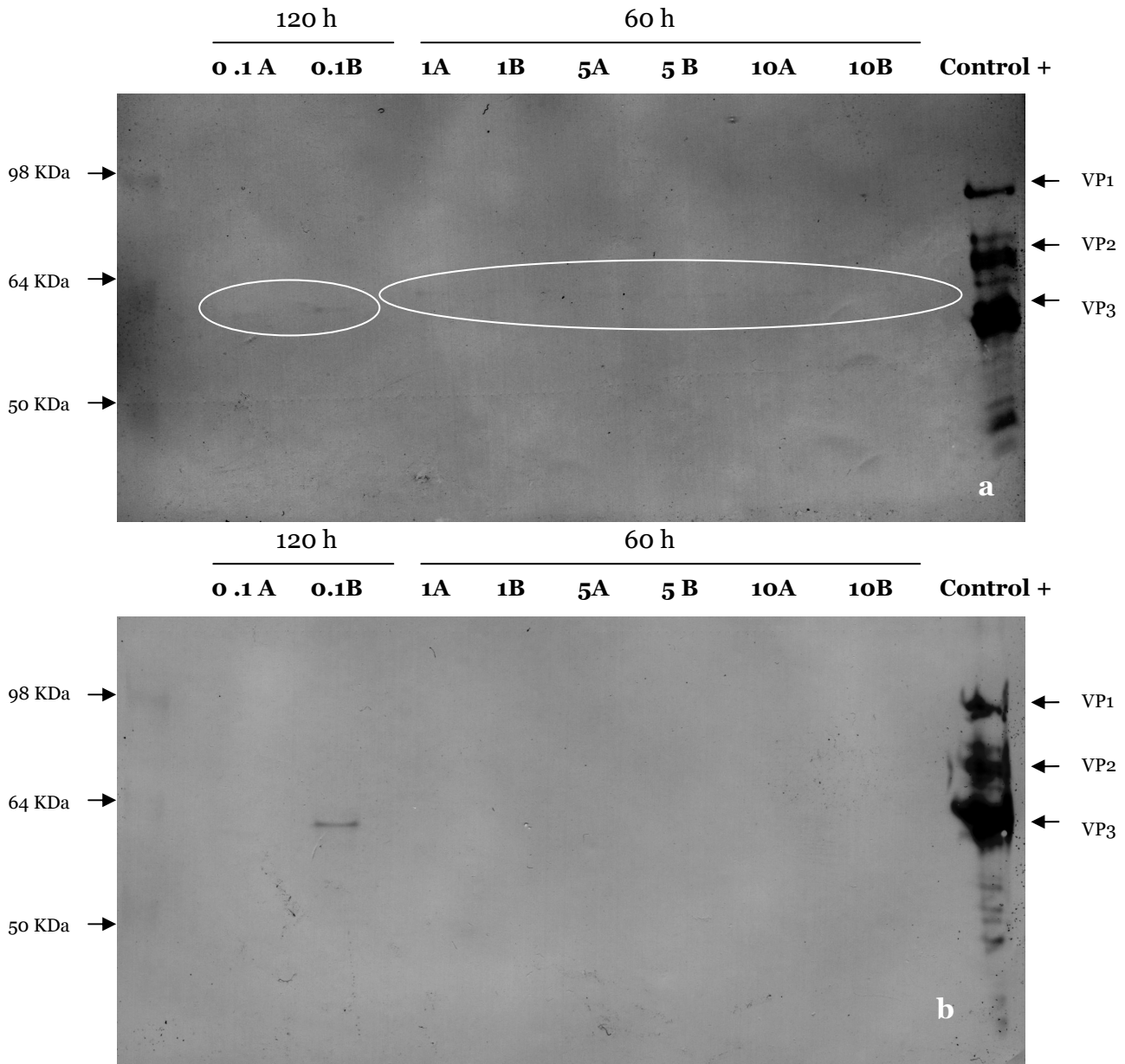


Figura 21. Western blot con anticuerpo B1 de fracciones recolectadas del HPLC de exclusión en gel a partir de extractos de pellet de cultivos infectados con BacCap a diferentes MDI. Marcador de peso molecular: See Blue Plus (Invitrogen). Carriles 2-3: muestras correspondientes a las 120 hpi, carriles 4-9: muestras correspondientes a las 60 hpi, el número indica la MDI empleada, la letra indica la réplica del experimento. Carril 10: control positivo, proteína VP de VAA-2. (a) F2, los óvalos señalan la región donde se observó señal positiva con el anticuerpo. (b) F3.

Las muestras provenientes de la F1 no reaccionaron con ningún anticuerpo, aunque sí lo hicieron los controles positivos de proteína VP y de baculovirus. Todas las muestras de la F2 reaccionaron positivamente con B1 pero no con FastPlax™, corroborando que esta fracción contiene proteína VP de VAA pero no baculovirus. Las bandas observadas en las muestras de cultivos infectados a MDI de 0.1 UFP/cél tienen un PM aproximado de 60 KDa, peso similar al de VP3; en el resto de las muestras se observó una banda de PM similar al de aquella observada

entre VP2 y VP3 en el control positivo de VAA. Para la F3 se observó una banda intensa de aproximadamente 60 KDa para una muestra de cultivo infectado a MDI de 0.1 UFP/cél (figura 21 b). Esto confirmó la presencia de proteína VP agregada que eluyó a un tiempo promedio de 16.78 y 18.8 min (con diámetros de 23 y 15 nm, respectivamente, de acuerdo a la curva de calibración), por lo que puede suponerse la presencia de cápsides en la F2 y de cápsides incompletas o intermediarios de éstas en la F3. En ninguna fracción analizada se identificó baculovirus. Se pretendió confirmar la presencia de VAA en todos los casos en que se detectó proteína VP utilizando microscopía electrónica, sin embargo no se detectaron cápsides ensambladas. Esto puede atribuirse al proceso de concentración de las muestras obtenidas del HPLC, en las cuales se disminuyó el contenido de agua hasta 100 veces sin remover las sales de fosfato, lo cual probablemente desestabilizó las cápsides de VAA por la alta fuerza iónica.

Efecto del ADN en los patrones de absorbancia en HPLC

Puesto que los extractos de pellet analizados por HPLC no fueron tratados para eliminar el ADN celular y/o de baculovirus era probable que las fracciones colectadas estuvieran contaminadas con material genético de diversas longitudes, producto de la digestión con nucleasas. Ya que se utilizarían las mediciones de absorbancia en los cromatogramas para calcular la concentración de proteína en la F2 y determinar la cantidad de proteína ensamblada en cápsides, resultó indispensable definir si las fracciones purificadas contenían ADN que pudiera interferir con la señal de absorbancia a 280 nm. En todas las fracciones colectadas se corroboró la presencia de ADN mediante la técnica descrita en *Cuantificación de ADN residual*. Para determinar si el ADN podría alterar la señal de absorbancia a 280 nm, se realizaron inyecciones en el cromatógrafo de ADN λ estándar sin digerir, ADN λ estándar digerido con DNasa A y muestras de extracto de pellet a las que además se añadió ADN λ estándar digerido con DNasa A. Los μ g de ADN usados en todas las inyecciones equivalen a los μ g de ADN contenidos en la F2 colectada a partir de la inyección de un volumen definido de la muestra de proteína que se usó en este ensayo. El ADN sin digerir eluyó de los 14.2 a los 16 min (figura 22), mientras que el ADN digerido eluyó a partir de los 16.2 min, tiempos a los que eluyeron las fracciones recolectadas en los cultivos infectados con BacCap. En la muestra con proteína de extracto de pellet con y sin ADN no se observó diferencia en la absorbancia medida en el intervalo de tiempo en que eluyen las fracciones F0, F1, F2 y F3 de los cultivos infectados, por tanto se consideró que la presencia de ADN no afectó la cuantificación de partículas de VAA, considerando los valores de absorbancia a 280 nm en los cromatogramas. Esto constituye una ventaja metodológica ya que no es necesario realizar tratamientos de eliminación de ADN previos a la cuantificación de partículas.

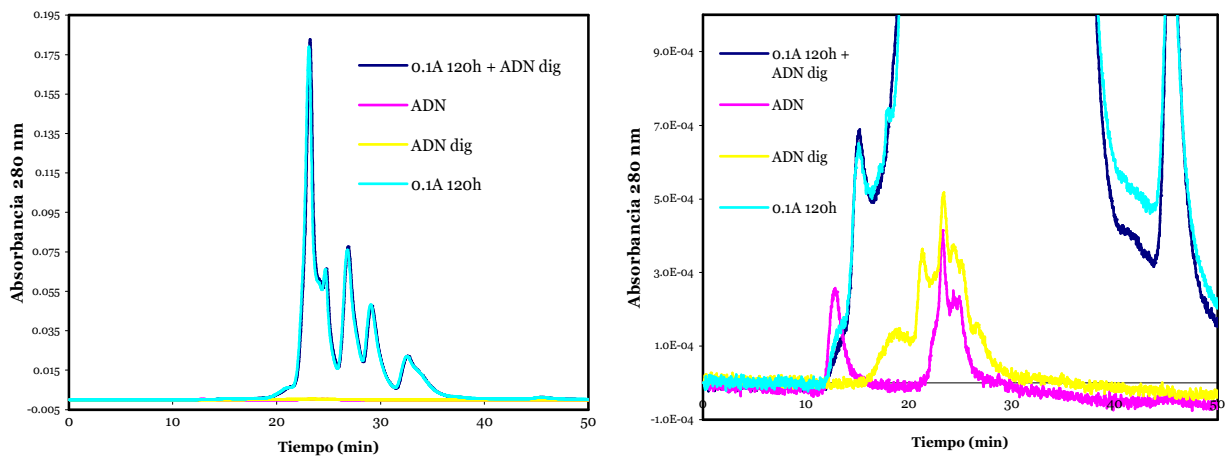


Figura 22. (a) Perfiles cromatográficos de ADN digerido, ADN sin digerir; muestra de extracto de pellet, y muestra de extracto de pellet a la cual se añadió ADN digerido usando las columnas Ultrahydrogel 2000 y Ultrahydrogel 500 en serie con pre-columna, usando buffer de fosfatos 10 mM a pH 8. (b) Ampliación de figura 20 a.

El método desarrollado para cuantificar partículas reveló diferencias en el patrón cromatográfico de muestras infectadas y no infectadas con BacCap. No se observó interferencia en la señal de absorbancia a 280 nm a causa de la presencia de ADN en las muestras analizadas. Además permitió recuperar las fracciones de interés para la identificación de proteína VP.

Rendimientos de ensamblaje de proteína VP

Para cuantificar rendimientos de ensamblaje y concentración de cápsides en las muestras analizadas se realizaron los cálculos descritos en Cuantificación de cápsides de VAA empleando cromatografía de exclusión en gel. Los valores de ensamblaje obtenidos para algunas muestras se presentan en la figura 23, estos variaron aproximadamente entre 2 y 11.5%. Esto indica que la eficiencia con la que se ensamblaron las proteínas VP fue baja en relación con la cantidad de proteína acumulada en pellet. La eficiencia de ensamblaje fue mayor a 10 UFP/cél, y a 0.1 UFP/cél la eficiencia disminuyó casi 4 veces de las 96 a las 120 hpi. Resulta difícil determinar qué tan bueno es el ensamblaje en un sistema recombinante cuando no se cuenta con datos de rendimientos de ensamblaje para el virus silvestre en sus células huésped. Por ello se realizó una comparación entre la concentración real de cápsides de VAA y la concentración teórica que podría lograrse en el sistema recombinante considerando la cantidad de proteína VP producida. Para realizar el cálculo teórico se consideró la relación estequiométrica de las proteínas VP en las muestras de fracción de pellet, mismas que se muestran en la figura 24. Ésta se calculó dividiendo las concentraciones de cada VP entre la concentración de VP2 a cada MDI y tiempo de muestreo. Considerando que la estequiometría reportada para cápsides de VAA-2 es de 1:1:10 (VP1:VP2:VP3) se observa que sólo la muestra marcada con asterisco contiene VP3 en exceso

para el ensamblaje y donde VP2 es la limitante estequiométrica para el ensamblaje. Por tanto, para el cálculo teórico de cápsides se consideró únicamente la concentración de VP3 en pellet, suponiendo la incorporación de 50 moléculas de VP3 por cápside (Rose et al., 1971) hasta su agotamiento total, excepto en la muestra señalada con asterisco en la figura 23, para la cual se tomó como limitante la concentración de VP2 en pellet, y se consideró la incorporación de 5 moléculas de VP2 por cápside (Rose et al., 1971).

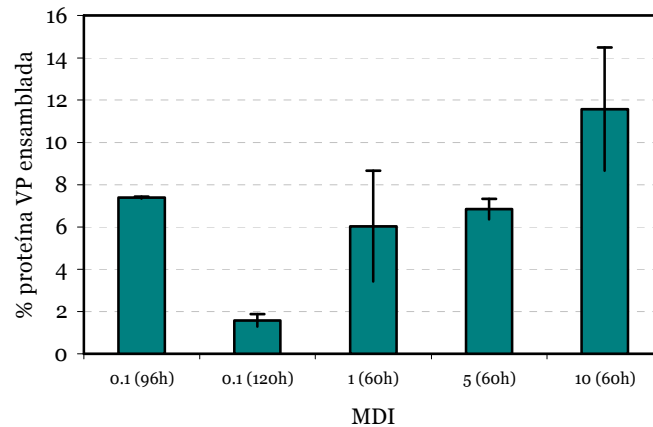


Figura 23. Rendimientos de ensamblaje de proteína VP con respecto a la proteína VP acumulada en pellet. En el eje x se indica la MDI, entre paréntesis se indica el tiempo post-infección en que se colectó la muestra. Todos los datos corresponden al promedio de cultivos por duplicado. Las barras representan la diferencia entre ambos experimentos.

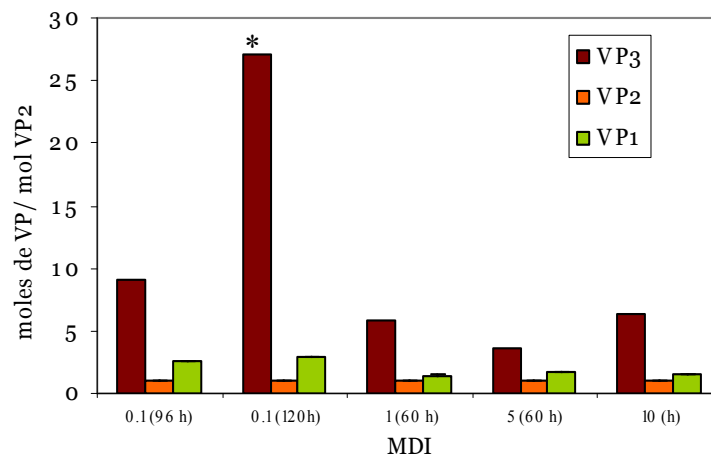


Figura 24. Relación estequiométrica de proteína VP en muestras de pellet. Los datos se muestran como mol de proteína VP respecto a mol de VP2. El asterisco indica un exceso en la concentración de VP3 para el ensamblaje, en este caso la concentración de VP2 es la limitante. Todos los datos corresponden al promedio de cultivos por duplicado. Las barras representan la diferencia entre ambos experimentos.

Las concentraciones teóricas de cápsides hacen referencia a las concentraciones máximas posibles en este sistema según la estequiometría entre las proteínas VP obtenida. Las concentraciones reales alcanzadas son un orden de magnitud menores que las teóricas (figura

25). Esto podría deberse a un ineficiente transporte de VP's al núcleo, que podría hacerse evidente mediante inmunodetección *in situ* y microscopía electrónica.

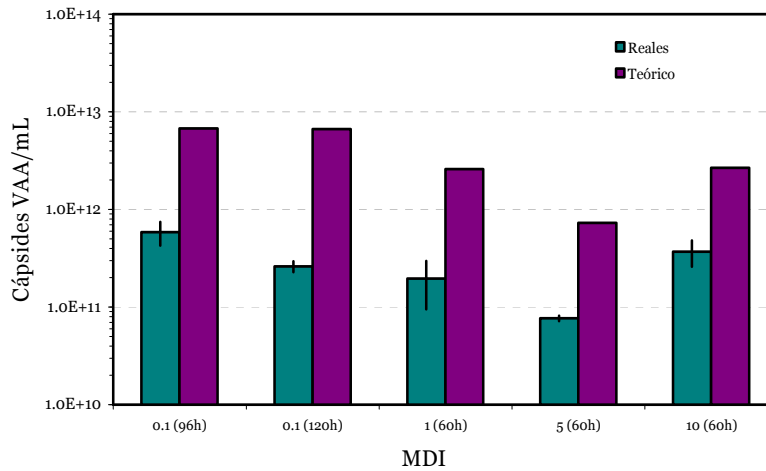


Figura 25. Cápsides/mL producidas en cultivos infectados con BacCap. En el eje x se indica la MDI, entre paréntesis se indica el tiempo post-infección en que se colectó la muestra. Los datos en verde corresponden al promedio de cultivos por duplicado. Las barras representan la diferencia entre ambos experimentos.

Tanto el cálculo real como el teórico presentaron la misma tendencia cuando se consideró a VP3 como limitante para el ensamblaje, por lo que la concentración de VP3 parece ser determinante en este proceso (Redemann et al., 1989). Sólo a MDI de 0.1 UFP/cél (120 hpi) la concentración de VP3 no fue limitante, en esta muestra se observó incluso una disminución de casi el 50% en los rendimientos de proteína ensamblada con respecto a las 96 hpi, aún cuando el rendimiento teórico calculado considerando a VP2 como limitante era muy similar. Al cuantificar cápsides en la fracción de sobrenadante a las 120 hpi se obtuvo una concentración de partículas 10 veces menor a la encontrada en pellet, la cual no es equivalente a la disminución en la concentración observada en el pellet. Esta caída en el número de cápsides puede deberse a efectos de degradación por actividad proteolítica en las células, por lo que el tiempo de cosecha deberá ser un factor importante a considerar durante la producción de vVAA.

Las máximas concentraciones de cápsides se obtuvieron al infectar a 0.1 y 10 UFP/cél, mientras que la más baja se alcanzó a 5 UFP/cél, donde se obtuvo la menor concentración de VP3. Por ello la MDI óptima para la producción de cápsides vacías de VAA fue de 0.1 UFP/cél, ya que se requirió infectar con menos baculovirus para alcanzar los mismos rendimientos que a altas MDI. Esto podría no ser tan factible para la síntesis de cápsides con material genético puesto que una MDI de 0.1 UFP/cél implica que una fracción baja de la población será infectada al inicio de la infección, reduciendo así la probabilidad de coinfección con los baculovirus que expresan los demás componentes de VAA desde el inicio del cultivo. Si bien casi el total de la población

resultará infectada a tiempos post-infección más avanzados a causa de una infección secundaria, es posible que la producción de los componentes de VAA no se lleve a cabo con una secuencia temporal que favorezca la producción de PT de vVAA. Sin embargo, esto deberá confirmarse realizando coinfecciones a bajas MDI y evaluando los rendimientos de PT.

Con los resultados obtenidos en esta sección se observó que BacCap tiene un impacto severo sobre la viabilidad de los cultivos aún a MDI bajas. La concentración máxima de cada VP así como los rendimientos más altos de proteína ensamblada se obtuvieron a MDI de 0.1 UFP/cél. El método desarrollado para cuantificar proteína VP total mostró que existe una gran cantidad de proteína viral degradada, la cual se desconoce con certeza si podría formar parte de cápsides ensambladas. Para descartar o confirmar si los fragmentos de proteína VP pueden ensamblarse, podrían analizarse fracciones recuperadas por HPLC de exclusión en gel (con las condiciones reportadas en este trabajo) provenientes de muestras concentradas de cápsides purificadas para observar el patrón electroforético de las proteínas de la cápside con diferentes anticuerpos. Además, el método de cuantificación de cápsides desarrollado en este trabajo facilitará los estudios posteriores de producción de partículas transductoras y de PPV de VAA con aplicación distinta a la terapia génica.

Estudio de producción de proteínas Rep y vVAA utilizando diferentes stocks virales de BacRep

Los datos presentados en esta sección fueron reportados por Aucoin et al. (2006), con quien se trabajó en colaboración durante la realización de estos experimentos.

Expresión de proteínas Rep a partir de stocks de BacRep de diferente número de pase

Las proteínas Rep juegan un papel indispensable durante la replicación (Ni et al., 1994; Ward et al., 1994) y el empaquetamiento (King et al., 2001) del ADN viral en cápsides de VAA. Por este motivo se decidió determinar si los niveles de expresión de estas proteínas podrían verse influidos por el stock viral utilizado para su producción. Con este fin se realizaron infecciones con el baculovirus BacRep utilizando stocks de diferente número de pase para analizar la cantidad relativa de proteína Rep producida con cada stock.

Se observó que la expresión de Rep52 disminuyó conforme aumentó el número de pase del stock viral (figura 26). Analizando la concentración relativa de las proteínas por densitometría de las

películas de Western blot y considerando como 100% de nivel de expresión durante la infección con el pase 2 (P2), se observó una caída del 19% en la expresión de Rep52 al infectar con el pase 3 (P3) y del 66% al infectar con el pase 4 (P4). No se evaluó la expresión de Rep78 ya que no fue posible observar la banda correspondiente a su peso molecular.

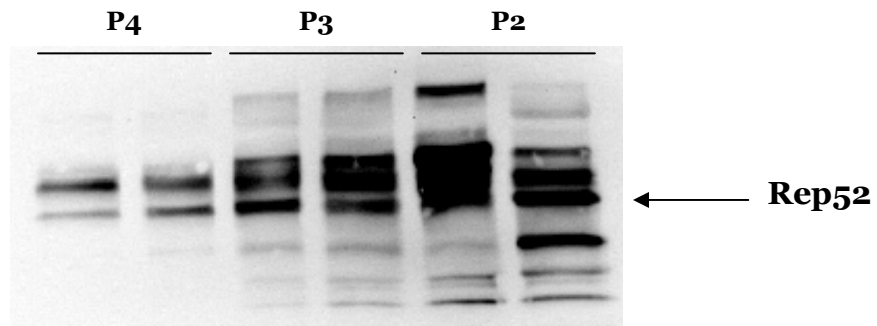


Figura 26. Western blot de muestras de extracto de pellet en infecciones individuales con stocks de BacRep de diferente número de pase.

En coinfecciones con los baculovirus BacGFP y BacCap se observó también una disminución en la expresión de Rep52 al aumentar el número de pase de BacRep (figura 27). Analizando la concentración relativa de esta proteína, tal como se hizo para las infecciones individuales, se calculó una disminución del 35.6% en la expresión infectando con el P3, y del 39.8% infectando con el P4. En el cultivo control no infectado (NI), el anticuerpo reaccionó con proteínas celulares dando un patrón distinto al obtenido en las muestras de cultivos infectados. La reacción inespecífica con el cultivo control puede deberse a la alta concentración de proteína colocada en el carril. Esto debido a que se colocó el mismo volumen de muestra en todos los carriles y en el cultivo control se alcanzó una concentración celular mayor que en los cultivos infectados y la concentración de proteína fue más alta.

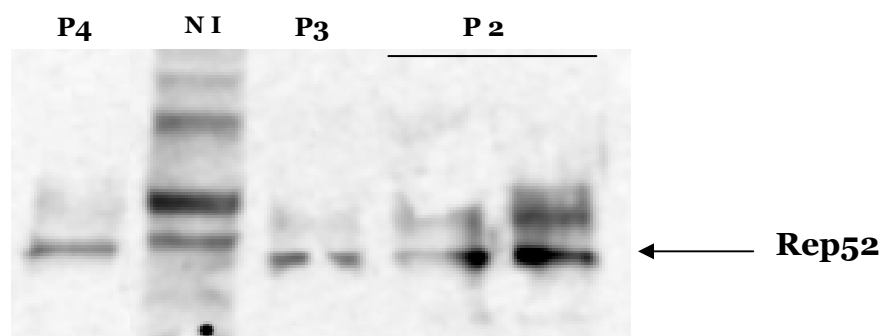


Figura 27. Western blot de extractos de pellet en coinfecciones con BacGFP (P3), BacCap (P3) y BacRep de diferente número de pase. Los números de pase señalados corresponden a BacRep. NI: No infectado. Se colocó el mismo volumen de muestra en todos los carriles.

Durante la replicación del baculovirus pueden llevarse a cabo procesos de recombinación que den como resultado deleciones en la secuencia codificante de alguna proteína. Cuando las deleciones en el genoma tienen como resultado la pérdida de la capacidad infectiva del baculovirus se producen los llamados virus defectuosos (VD) dentro del stock viral. Se ha observado que en stocks de baculovirus recombinantes derivados de AcMNPV, tales como BacRep, es muy común que se produzcan virus defectuosos al infectar a MDI altas (Miller 1996), por tanto es posible disminuir la proliferación de estos virus utilizando bajas MDI durante la amplificación de los stocks. La región que codifica para la poliedrina está comprendida en la región que se pierde en algunos virus defectuosos denominados mutantes FP (*Few Polyhedra mutants*), es por ello que la acumulación de estos virus además de interferir con la replicación viral, provoca una disminución en los rendimientos de proteína recombinante (Wickham et al., 1991; O'Reilly et al., 1994; Piljman et al., 2001). Otras deleciones pueden dar como resultado únicamente la pérdida de la secuencia codificante para la proteína recombinante, sin afectar la capacidad infectiva del baculovirus.

En estos experimentos se utilizó la misma MDI para los 3 stocks de BacRep, tanto en infecciones individuales como en coinfecciones con BacCap y BacGFP, sin embargo, con estos resultados no fue posible definir si la diferencia observada en la expresión de Rep52 era debida a la acumulación de VD en el stock viral o a pérdidas específicas en la secuencia de esta proteína durante el proceso de amplificación de los stocks de BacRep.

No se realizó un análisis comparativo entre los niveles de expresión de Rep52 en infecciones individuales y en coinfecciones, pero es posible que la expresión disminuya durante las coinfecciones puesto que la maquinaria celular estará enfocada además a la producción de proteína VP y GFP.

Producción de vVAA utilizando stocks de BacRep de diferente número de pase

A partir de las coinfecciones con los 3 baculovirus se produjeron vectores completos de VAA-2. Puesto que se observaron diferencias en las concentraciones relativas de Rep52 con diferentes stocks de BacRep se decidió evaluar el efecto de estas concentraciones relativas sobre los rendimientos de partículas transductoras (PT).

Se observó que la producción de PT presentó una tendencia similar a la observada en la producción de Rep52 durante las coinfecciones. Considerando como 100% al número de PT

producidas con el P2 se calculó que la producción disminuyó un 54% al infectar con el P3, y un 80% al infectar con el P4 (figura 28).

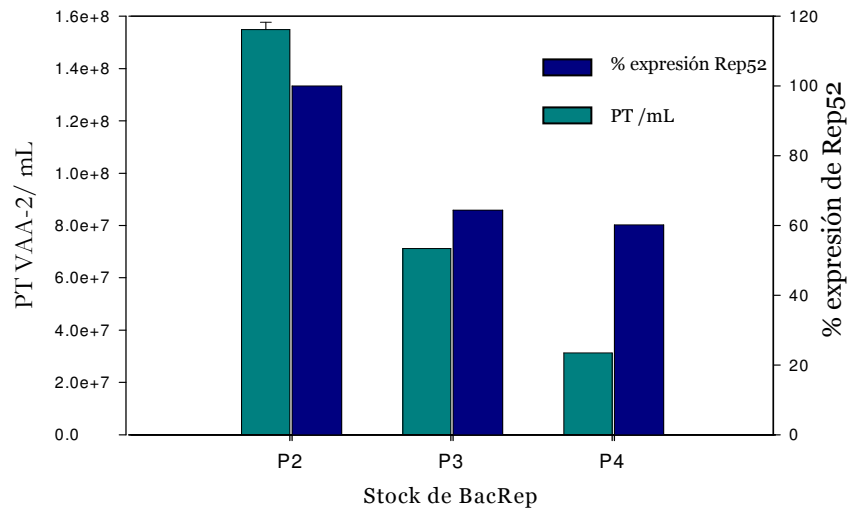


Figura 28. Expresión de Rep52 y producción de partículas transductoras de vVAA a partir de coinfecciones con BacFGP (P3) y BacCap (P3), utilizando stocks de BacRep de diferente número de pase. Los datos corresponden al promedio de cultivos por duplicado. Las barras representan la diferencia entre ambos experimentos.

Li et al., (1997) reportaron que la sobre-expresión de los genes Rep ocasiona una disminución en los niveles de producción de vVAA, donde el efecto principal de la sobre-expresión de proteínas Rep fue una disminución en los niveles de expresión de los productos derivados del promotor *p40* de VAA, es decir, una disminución en la producción de proteína VP y, por tanto, de cápsides virales. En el SCI-VB los promotores utilizados para la expresión de las proteínas de VAA son distintos de los empleados por el virus silvestre, por tanto, no debería existir este efecto de represión en la expresión de VP's a causa de una sobre-expresión de proteínas Rep; por el contrario, utilizando este sistema se ha observado que al disminuir la expresión de Rep52 se produce una caída en el número de partículas transductoras (figura 28) y viceversa (Aucoin et al., 2006; Meghrouh et al., 2005). Estos resultados implican que la manipulación de la concentración de las proteínas Rep por medio de la MDI puede influir en los rendimientos de partículas transductoras. Por tanto resulta necesario un estudio más extenso acerca del efecto de la concentración de estas proteínas sobre los procesos de replicación y encapsidación de genomas recombinantes durante la producción de vVAA en células de insecto para desarrollar estrategias racionales a fin de mejorar los rendimientos de partículas transductoras.

En el sistema de expresión utilizado en este trabajo Rep78 es la responsable de la liberación de los genomas recombinantes de VAA a partir del genoma del baculovirus en BacGFP. El no contar

con información sobre los niveles de expresión de esta proteína, así como del número de genomas recombinantes libres en este sistema imposibilita conocer si el proceso de liberación y replicación de los genomas fue una limitante para la producción de partículas transductoras.

Amplificación de stocks y cálculo de título viral

La amplificación de los stocks virales debe llevarse a cabo a MDI por debajo de 0.1 UFP/cél con el fin de evitar la proliferación de virus defectuosos (VD) (O'Reilly et al., 1994). Para que un VD pueda replicarse en la célula es necesaria la coinfección con virus que no han perdido su capacidad para replicarse. La probabilidad de que una célula sea infectada por más de un virus disminuye empleando bajas MDI (Palomares et al., 2002), por tanto, como ya se mencionó, una estrategia para evitar la replicación de VD en los stocks virales es el uso de MDI bajas.

Los stocks virales con que se trabajó inicialmente fueron proporcionados por el Dr. Kamen y corresponden al P3 de los baculovirus BacGFP, BacCap y BacRep. A partir de estos baculovirus se generaron los stocks del P4 usando una MDI de 0.1 UFP/cél para BacGFP y BacRep, y una MDI de 0.01 UFP/cél para BacCap. Los títulos virales calculados para estos stocks se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Títulos virales obtenidos usando el método desarrollado por Mena et al. (2003)

Baculovirus	P3 (UFP/mL)	P4 (UFP/mL)
BacGFP	$1.64 \times 10^6 \pm 0.20 \times 10^6$	$4.59 \times 10^6 \pm 0.20 \times 10^6$
BacRep	$1.89 \times 10^6 \pm 0.13 \times 10^6$	$4.24 \times 10^6 \pm 0.08 \times 10^6$
BacCap	$7.21 \times 10^4 \pm 0.56 \times 10^4$	$1.39 \times 10^7 \pm 0.09 \times 10^7$

Los títulos virales de los stocks de BacRep y BacGFP casi se duplicaron después de la amplificación, sin embargo el título de BacCap aumentó 3 órdenes de magnitud al ser amplificado. Durante la amplificación de baculovirus es común obtener títulos del orden de 10^8 a 10^9 UFP/mL (Tsai et al., 2007). Los títulos obtenidos después de la amplificación sugirieron que la presencia de VD en los stocks P3 de todos los baculovirus podría estar afectando la amplificación de los baculovirus, lo que a su vez afectaría la expresión de las proteínas recombinantes (O'Reilly et al., 1994). Por esta razón se llevó a cabo un aislamiento en placa para seleccionar placas virales que fueran buenas productoras de proteína recombinante para iniciar nuevos stocks virales reduciendo la contaminación con virus defectuosos. Se analizaron 4 placas virales para BacGFP y BacRep, y 5 placas virales para BacCap. El análisis de la expresión de proteína recombinante en las placas de cada baculovirus se describe a continuación.

Expresión de GFP

BacGFP posee el gen de GFP flanqueado por las ITR de VAA-2. Las ITR son regiones palindrómicas susceptibles de recombinación homóloga, proceso que se lleva a cabo entre secuencias homólogas de ADN (Lewin, 1997) y puede ocurrir durante la replicación del genoma del baculovirus. La recombinación homóloga puede resultar en la pérdida del casete de expresión contenido entre las ITR. Kohlbrenner et al. (2005) reportan una disminución en el número de genomas libres de vVAA-2 conforme aumenta el número de pase de BacGFP. Esta disminución provocó una caída de casi un orden de magnitud en el rendimiento de PT cuando se utilizaron los stocks virales del P2 y P5. Este efecto puede ser consecuencia de la acumulación, en los stocks virales, de baculovirus que han perdido la secuencia del genoma recombinante de VAA-2 por procesos de recombinación, lo cual representa una problemática inherente de este sistema que repercute negativamente en la producción de vectores de VAA, y que no puede ser reducido manipulando la MDI durante la amplificación.

Para reducir la acumulación de VD, así como de virus que hayan perdido la secuencia del genoma recombinante, se decidió amplificar el stock viral de BacGFP a partir de una placa aislada que fuera buena productora de GFP. Para ello se analizaron pellets celulares recuperados de infecciones con distintas placas aisladas de BacGFP. Los resultados se muestran en la tabla 10 como unidades relativas de fluorescencia (URF). Con base en estos resultados se eligió a la placa 2 (*p2*) para reamplificar el stock viral de BacGFP. Si bien el baculovirus aislado de la placa 5 (*p5*) produjo más URF que el aislado de la *p2* se eligió ésta última por provenir de una dilución viral mayor, donde las placas estaban mejor delimitadas, tal como se observa en la figura 29.

Tabla 10. Análisis de expresión de GFP en diferentes *placas* virales.

Placa	Dilución en ensayo en placa	URF
Blanco	Sin infectar	-
1	10 ⁻⁵	13.33
2	10 ⁻⁵	44.05
4	10 ⁻⁴	0.91
5	10 ⁻³	46.11

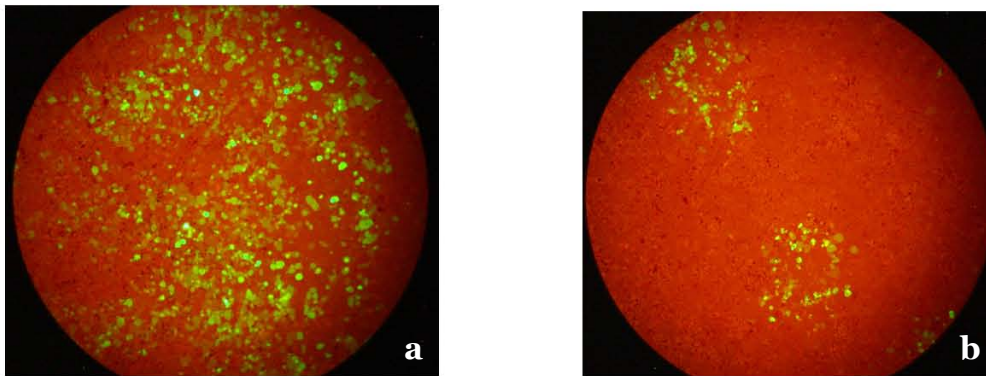


Figura 29. Células Sf9 infectadas con BacGFP observadas en microscopio de epifluorescencia. a) dilución 10^{-3} y b) dilución 10^{-5} . Amplificación 10X.

En este ensayo se consideró que la expresión de GFP sería proporcional al número de copias del genoma recombinante de VAA-2 presente en la placa viral. El que la placa seleccionada fuera buena productora de GFP se interpretó como un indicador de que el número de baculovirus aislados a partir de esa placa y que perdieron la secuencia del genoma recombinante de VAA-2 fue menor que para las otras placas. Cabe mencionar que los stocks virales de BacGFP deberán ser amplificados constantemente utilizando esta metodología debido a la considerable disminución en los rendimientos de PT al utilizar stocks de número de pase mayor a 3 (Kohlbrenner et al., 2005).

Expresión de proteínas VP

Se utilizó el anticuerpo B1 para detectar expresión de proteínas de la cápside. De los virus aislados de 5 placas, se detectó expresión de VP en las placas 4 y 5, siendo la última la mejor productora y, por tanto la seleccionada para amplificar el stock viral (figura 30). Es muy probable que en las placas virales donde no se detectó expresión de proteína VP existiera un gran porcentaje de virus defectuosos del tipo FP (Few Polyhedra mutants) en los que se pierde la región que codifica para la poliedrina. La acumulación de estos virus además de interferir con la replicación viral, provoca una disminución en los rendimientos de proteína recombinante (Wickham et al., 1991; O'Reilly et al., 1994; Piljman et al., 2001). Se ha observado que estos VD llegan a producir altos títulos virales, capaces de producir una infección secundaria en coinfección con virus intactos (O'Reilly et al., 1994). Si el número de virus defectuosos que infecta una célula es mayor al de virus intactos se obtendrá una clara sobreproducción de los primeros en comparación con los segundos, y a pesar de observar muerte celular a causa de la infección viral los niveles de expresión de proteína recombinante serán muy bajos. Es probable

que la cantidad de muestra analizada, o que la sensibilidad del ensayo no haya bastado para detectar bajos niveles de expresión de proteína VP.

En la figura 30 se observa que las bandas correspondientes a VP1, VP2 y VP3 coinciden con el peso molecular reportado (marcador de PM: BenchMark™ Ladder, Invitrogen™. Las bandas del marcador de PM indicadas con lápiz en la membrana no se aprecian en la imagen digital).

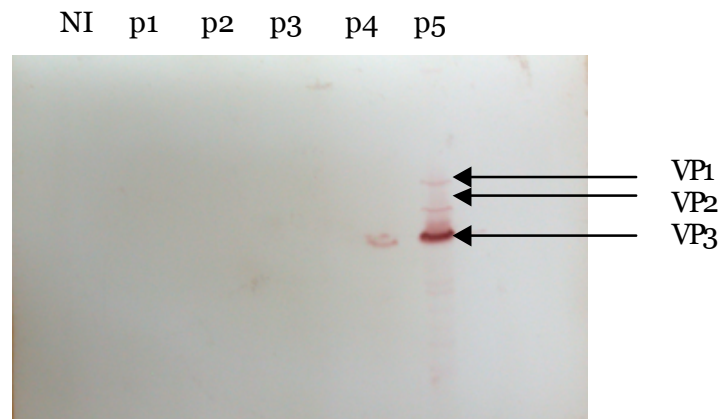


Figura 30. Western blot para detectar expresión de proteínas VP en placas de BacCap usando el anticuerpo B1, marcador de peso molecular BenchMark™ Ladder (Invitrogen™). NI: no infectado.

Analizando las películas de Western blot por densitometría se calculó una relación 1:1.14:6.4 entre VP1:VP2:VP3. Resulta interesante observar que la estequiometría de las proteínas VP producidas en células Sf9 en este experimento fue distinta a la observada durante la producción de proteína VP en células High Five™. Esto puede deberse a diferencias en la maquinaria de expresión de proteínas o a la actividad proteolítica de las células, que se ha reportado es mayor para la línea celular High Five™ (Martensen y Justensen, 2000). La amplificación del nuevo stock se realizó siguiendo la metodología utilizada para amplificar el stock de BacGFP.

Expresión de proteínas Rep

Para detectar las proteínas expresadas por BacRep se utilizó el anticuerpo monoclonal 259.5 que reconoce a todas las proteínas Rep de VAA-2. Nuevamente se observó reconocimiento inespecífico del anticuerpo por el control negativo (células sin infectar). Las infecciones con los baculovirus aislados de las 4 placas estudiadas dieron como resultado un patrón de bandas muy similar al control negativo, excepto que en la infección con baculovirus aislados de la p4 observamos 2 bandas muy tenues de peso molecular cercano a los 70 y 60 KDa que no se observan en el resto de las muestras (figura 31). Estas bandas podrían ser Rep 78 y Rep 52. Sin

embargo la reacción inespecífica del anticuerpo con el control sin infectar hace que este resultado no sea confiable. En este caso no fue posible elegir una placa viral para amplificar el stock de BacRep, puesto que no fue posible identificar con certeza la producción de proteínas Rep en las placas analizadas.

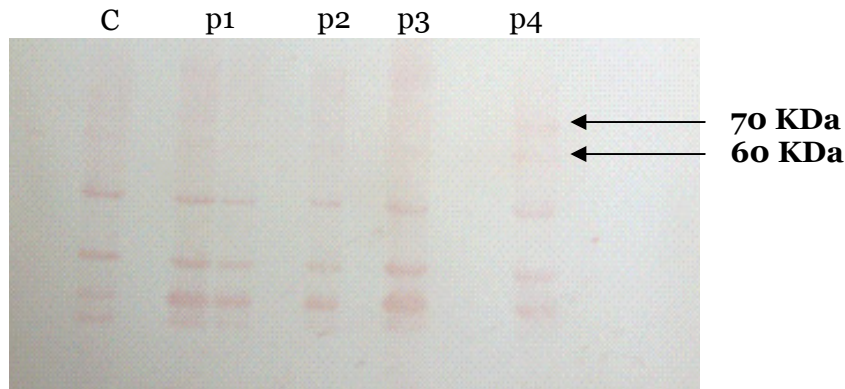


Figura 31. Western blot para detección de proteínas Rep con el anticuerpo monoclonal 259.5. C: control no infectado, p#: placa #.

Tal como ocurre para BacGFP, en BacRep la pérdida de expresión de la proteína recombinante puede tener dos orígenes: 1) la acumulación de virus defectuosos, y 2) la pérdida de las secuencias de Rep78 y Rep52 por procesos de recombinación homóloga. En BacRep las secuencias que codifican para estas proteínas se encuentran insertadas en posición *head-to-head*, de modo que al ser secuencias idénticas que sólo difieren en la longitud del fragmento forman un palíndromo casi perfecto. Por ello es probable que durante la replicación viral, además de producirse virus defectuosos, se lleven a cabo procesos de recombinación homóloga en esta secuencia palindrómica, lo que daría como consecuencia una pérdida gradual de los genes *rep* en los stocks virales conforme aumenta el número de pase, aún cuando no se pierdan otras secuencias que afecten la capacidad infectiva del virus. En este trabajo se observó disminución en la expresión de Rep52 conforme aumentó el número de pase del stock viral (sección *Estudio de producción de proteínas Rep y vVAA utilizando diferentes stocks virales de BacRep*), sin embargo no se determinó la causa de esta disminución.

Durante la realización de este estudio, Kohlbrenner et al. (2005) publicaron un reporte donde hacen mención de la disminución de la expresión de ambas Rep conforme aumenta el número de pase de BacRep, utilizando el mismo sistema de expresión que nosotros. Una solución que propusieron para este problema fue construir, a partir de los casetes de expresión contenidos en BacRep, 2 nuevos baculovirus para expresar independientemente Rep78 y Rep52. Con esta modificación observaron que después de amplificar los stocks virales la expresión de ambas

proteínas se mantuvo prácticamente constante al menos hasta el pase 5, por lo que se puede suponer que la disminución de los niveles de expresión de estas proteínas se debía principalmente al proceso de recombinación de las secuencias Rep y no a la acumulación de virus defectuosos.

Construcción de nuevos baculovirus para la expresión de Rep52 y Rep78

Con base en los resultados presentados en este trabajo y en los reportados por Kohlbrenner et al. (2005) se consideró inconveniente continuar con los estudios de producción de proteínas Rep, así como de replicación y amplificación de genomas recombinantes durante la producción de PT de VAA utilizando BacRep como vector para la expresión de Rep78 y Rep52. Por ello se decidió descartar el stock de BacRep para producir nuevos baculovirus y utilizar una construcción diferente con el fin de expresar Rep78 y Rep52 de manera independiente. La estrategia diseñada para tal fin se describe en *Materiales y Métodos*. Los oligos diseñados para la amplificación de los casetes de expresión de Rep78 y Rep52 se describen en la tabla 11.

Tabla 11. Oligos diseñados para amplificar el casete de expresión de Rep78 y Rep52 a partir de pFBDLSR.

Nombre	Secuencia	Tm, °C
pRep52-F	5´ GGT GAG CGG ATA TGA GCC CG 3´	57
pRep52-R	5´ CGG TAC CGC ATG CTA TGC ATC 3´	57
pRep78-F	5´ TTG CGA GAT GTT TAT CAT TTA ATT ATC 3´	54
pRep78-R	5´ GCA GGC TCT AGA TTC GAA AGC 3´	59

Utilizando los oligos pRep78-F y pRep78-R se obtuvieron productos de amplificación de aproximadamente 2500 bp (figura 32), que corresponden al tamaño esperado para el casete de expresión de Rep78. Para los oligos pRep52-F y pRep52-R se esperaba un producto de PCR de aproximadamente 1500 bp, sin embargo se obtuvieron diversos productos de longitud menor. Los productos obtenidos con ambos pares de oligos se purificaron para verificar las secuencias y evaluar la necesidad de modificar las condiciones de amplificación para obtener productos de mayor longitud con los oligos pRep52 F y R.

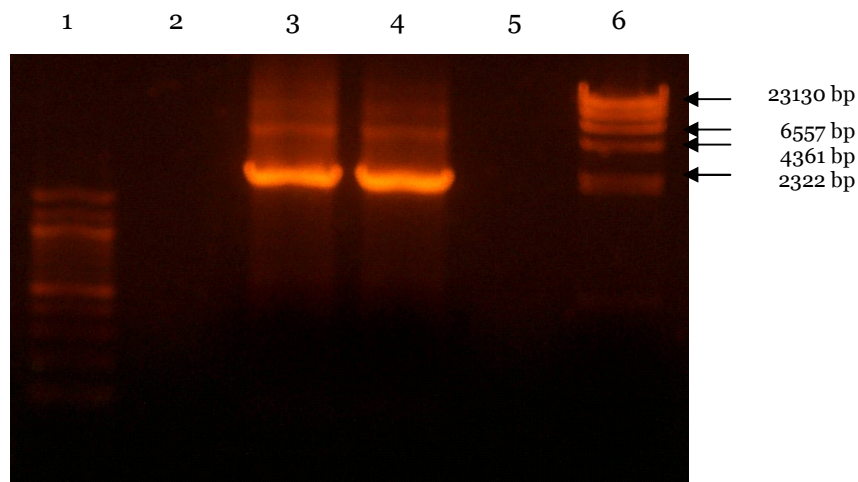


Figura 32. Productos de amplificación a partir del plásmido pFBDSLRS. Carriles 1 y 6: marcadores de peso molecular. Carriles 3 y 4: Productos de PCR obtenidos con los oligos pRep78-F y R.

La secuencia de los amplicones con pRep78-F y R tuvieron un 97% de identidad con la cadena antisentido del genoma de VAA-2 (bases 1487-2154) utilizando el oligo pRep78-R, y un 98% de identidad con la cadena sentido (bases 992-1291) utilizando el oligo pRep78-F. La región del genoma de VAA identificada codifica para la proteína Rep78, con lo que se confirmó que el amplicón correspondía al casete de expresión de Rep78 en pFBDSLRS. Sin embargo, las secuencias de los productos obtenidos con pRep52-F y R no correspondieron a la región esperada por lo que se consideró que estos oligos no resultaron apropiados para el fin que fueron diseñados.

Con el objeto de amplificar el producto de PCR obtenido para Rep78 y confirmar el resto de la secuencia, se digirió el amplicón con la enzima de restricción *Xba* I y se ligó al vector linealizado pFastBac-b para producir el vector pFastBac-Rep78. Se transformaron células *E. coli* TOP10 y el ADN plasmídico aislado se envió a secuenciar con los oligos pRep78-F y R, sin embargo no fue posible obtener las secuencias; por lo que la construcción de los baculovirus para la expresión de Rep78 y Rep52 quedó inconclusa en este trabajo.

Diseño de oligos para amplificación de ADN viral

Oligos para amplificación de genes Rep78 y Rep52

Debido a que se requiere construir nuevos baculovirus recombinantes para la expresión de Rep78 y Rep52 será necesario corroborar la presencia del casete de expresión de cada proteína en el genoma de estos nuevos baculovirus, que si bien se puede llevar a cabo con inmunoblots

evaluando la expresión de proteína, la amplificación de las secuencias codificantes utilizando la técnica de PCR representa una alternativa rápida y práctica. Con este fin se diseñaron oligos para amplificar la región que codifica para cada una de las proteínas Rep en el baculovirus BacRep utilizando el software Gene Fisher. De igual manera se diseñó un par de oligos para amplificar el gen que codifica para el inhibidor apoptótico p35 de AcMNPV que se utilizó como control positivo en la amplificación de ADN viral. Estos oligos se describen en la tabla 12.

Tabla 12. Oligos para amplificación de secuencias de proteínas Rep.

Oligo	Secuencia	Tm °C
Rep52 -Forward	5' GCA GCC AAC TTG CAA CTG3'	56.9
Rep52- Reverse	5' GTT CAA AGA TGC AGT CAT CC3'	54.9
Rep78-Forward	5' ACG CAG CTT AGC ACA AAC G3'	59
Rep78- Reverse	5' CCA AAT CCA CAT TGA CCA GAT C 3'	58.4
p35-Forward	5' CCG GTA GAA ATC GAC GTG TC 3'	58.6
p35- Reverse	5' TTG CCC CAG CTC GAT TCT G 3'	59.6

Oligos para amplificación del gen de GFP

En BacGFP, el gen de la proteína verde fluorescente se encuentra flanqueado por las ITR's de VAA-2. Para que el casete de expresión de GFP flanqueado por estas ITR's se empaquete en las cápsides de VAA deberá encontrarse como ADN libre, es decir, no integrado al genoma del baculovirus. En trabajos anteriores donde se ha utilizado este sistema no se ha hecho distinción entre la forma libre y la integrada al baculovirus al momento de cuantificar "genomas de vVAA" producidos (Urabe et al., 2002; Meghrouh et al., 2005; Aucoin et al., 2006), de modo que se puede estar sobre-estimando la cantidad de "genomas de vVAA" disponibles para su empaquetamiento.

En este trabajo deseamos sentar las bases para discriminar entre los "genomas de VAA" libres y los que se encuentran integrados a BacGFP utilizando la técnica de PCR cuantitativo. Con este fin, utilizando el software Primer3 Output, se diseñó un par de oligos para la amplificación de un fragmento de 100 bases del gen que codifica para GFP, que podrán ser usados mediante PCR cuantitativo para cuantificar el número de copias totales del casete de GFP producidas durante la infección con BacGFP. De igual manera se diseñaron oligos para la amplificación de un fragmento de la misma longitud del gen de AcMNPV que codifica para el inhibidor apoptótico p35. Este gen se podrá ser utilizado como indicador del número de genomas de baculovirus. Las características de estos oligos se enlistan en la tabla 13.

Tabla 13. Oligos para amplificación de GFP y p35 por PCR cuantitativo

Oligo	Secuencia	Tm °C
GFP Rt -Forward	5' GGG CAC AAG CTG GAG TAC A 3'	60
GFP Rt- Reverse	5' ATG TTG TGG CGG ATG TTG AAG 3'	62
p35 Rt-Forward	5' TTG ATG GCC AAC AAT TTG AAC TC3'	63
p35 Rt- Reverse	5' GTT TTT CGA CGC TTC GTT GTA A 3'	62

Durante la producción de vVAA el genoma recombinante debe ser escindido del genoma del baculovirus por la acción endonucleasa de Rep78. Una vez liberado, la replicación del genoma recombinante puede ser independiente de la del genoma del baculovirus. Por tanto la diferencia en el número de copias de las secuencias codificantes para GFP y p35 permitirá estimar si, durante la infección con BacGFP, el casete de expresión flanqueado por las ITR's se encuentra o no en forma libre para ser encapsidado en partículas de VAA y en qué concentración. Esta información permitirá desarrollar estrategias para incrementar los rendimientos de partículas tansductoras de vVAA-2.

Amplificación de ADN viral

Se probaron todos los oligos diseñados a excepción del par p35-RT. La reacción de PCR se llevó a cabo utilizando ADN purificado de BacRep y BacGFP. Se obtuvieron productos de amplificación para todos los oligos probados (tabla 14 y figura 33).

Tabla 14. Productos de PCR a partir de ADN purificado de baculovirus.

Oligos	Tamaño amplicón (bp)	Tamaño esperado (bp)
p35-F y R	750	730
Rep52- F y R	1500	1440
Rep78- F y R	1200 y 400	2100
GFP Rt- F y R	100	100

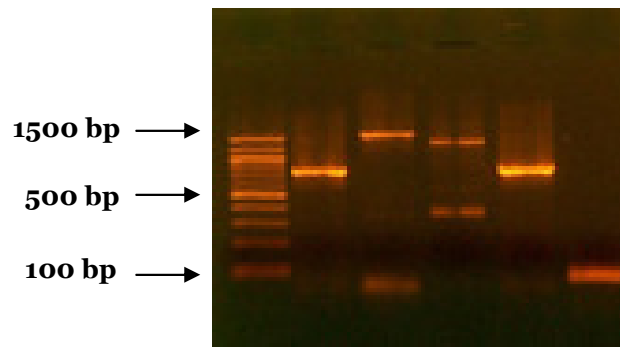


Figura 33. Productos de PCR de amplificaciones a partir de ADN viral. 1) Marcador peso molecular, 2) Gen p35 (BacRep), 3) Gen Rep52, 4) Gen Rep78, 5) Gen p35 (BacGFP), 6) Gen GFP.

Para todos los pares de oligos, con excepción de los oligos Rep78, se obtuvieron productos de PCR de longitud similar a la esperada. Es posible que esto se deba a que las condiciones de reacción utilizadas no favorecieron la amplificación del fragmento de 2100 bp, por lo que resulta necesario trabajar más sobre las condiciones de amplificación para mejorar la calidad del producto de PCR con estos oligos.

Los amplicones generados con los oligos Rep52 y Rep78 se enviaron a secuenciar para corroborar la identidad de los fragmentos. Las secuencias obtenidas se analizaron en el servidor del BLAST. La secuencia obtenida con el oligo Rep52-F tuvo un 99% de identidad (nucleótido 195 al 305) con la secuencia reportada para el promotor *polh* de AcMNPV (nucleótido 179 al 307 del gen de poliedrina), y un 98% de identidad (nucleótido 396 al 638) con la secuencia que codifica para Rep52 y Rep78 de VAA (nucleótido 992 al 1291 del genoma de VAA). De la secuencia obtenida con el oligo Rep52-R se observó un 97% de complementariedad (nucleótido 3 al 674) con la secuencia que codifica para las proteínas Rep52 y Rep78 de VAA (nucleótido 1487 al 2154 del genoma de VAA). Con estos resultados se corroboró la secuencia del casete de expresión de Rep52, por lo que se determinó que los oligos Rep52 resultarán útiles en el análisis del casete de expresión de la proteína Rep52 cuando se construya el nuevo baculovirus.

Al analizar la secuencia obtenida con el oligo Rep78-Reverse se encontró un 95% de complementariedad con la secuencia que codifica para las proteínas Rep78 (nucleótido 4 al 724) y Rep52 de VAA (nucleótido 1428 al 2137 del genoma de VAA). Con esta corta secuencia, que es común para ambas proteínas Rep, no fue posible confirmar la secuencia del casete de expresión de Rep78, por lo que deberán probarse otras condiciones de amplificación antes de utilizar estos oligos en la confirmación de la secuencia de Rep78 cuando se construya el nuevo baculovirus.

CONCLUSIONES

En este trabajo se presentan las primeras cuantificaciones de proteína VP. El método desarrollado para cuantificar proteína VP, por medio de densitometría de películas de Western blot, permitió la identificación y cuantificación de proteína VP sin necesidad de emplear etapas previas de purificación de la muestra problema. El único requerimiento de este método es la producción de un estándar de proteína VP cuya pureza determinará en gran medida la confiabilidad de las mediciones en las muestras problema.

Las mayores concentraciones de proteína VP, así como los mejores rendimientos de partículas ensambladas se obtuvieron a la MDI de 0.1 UFP/cél. Resulta necesario evaluar si a esta MDI se producen mejores rendimientos de PT que a MDI mayores durante coinfecciones con baculovirus que expresen proteínas Rep y genomas recombinantes. Sin embargo, los resultados obtenidos en este estudio pueden ser aplicados a la producción de partículas con aplicación distinta a la producción de vectores virales, como podría ser la nanobiotecnología.

Se observó que el 50% de las proteínas estructurales de VAA, con respecto al total producido, se acumuló en sobrenadante. Sin embargo, al emplear la centrifugación de gradientes de CsCl para purificar partículas de VAA se observaron bandas más intensas en las muestras provenientes de pellet, lo que implica que la proteína VP localizada en sobrenadante es liberada principalmente en forma desensamblada. Esto podría tener implicaciones en lo que respecta al transporte y la acumulación de proteínas VP en el núcleo, lugar donde se ensamblan en partículas, de lo cual no se tiene conocimiento en el SCI-BV.

BacCap produjo un efecto severo sobre la viabilidad de los cultivos infectados a las distintas MDI empleadas. La disminución de Xv a tiempos tan tempranos de infección como 48 hpi puede reducir el potencial de expresión alcanzado con el promotor *polh*, que puede mantener altos niveles de expresión hasta las 120 hpi. Se desconoce si este efecto negativo es por algún efecto citotóxico de las proteínas VP de VAA, tal como se ha reportado para las proteínas Rep, o si es un efecto provocado por la alta concentración de proteína recombinante expresada.

La relación estequiométrica a la que se produjeron las proteínas estructurales VP1:VP2:VP3 varió con las diferentes MDI utilizadas. Esta estequiometría puede estar afectada también por la degradación de proteína VP observada en las muestras, por lo que deberá analizarse la estequiometría de VPs en cultivos donde se empleen inhibidores de proteasas para observar si ésta cambia o permanece constante.

En este trabajo se reporta por primera vez un método de cuantificación de partículas de vVAA utilizando HPLC de exclusión en gel, que podría ser aplicado para la cuantificación tanto de partículas completas como de cápsidas vacías. Con este método se detectó proteína VP de VAA proveniente de muestras infectadas con BacCap en fracciones con tiempos de migración correspondientes a 15 y 23 nm de diámetro. Éste último coincide con el diámetro reportado para VAA, y con el observado mediante microscopía electrónica en las muestras infectadas con BacCap. La presencia de ADN en extractos de proteína crudos no interfirió con la absorbancia a 280 nm medida; por lo que con este método no resultará necesario eliminar el ADN en etapas previas a la cuantificación, lo que podría constituir una gran ventaja para aplicar este método de cuantificación en línea durante la producción de vVAA. Sin embargo, es necesario aún descartar la presencia de proteína ajena a VAA en la fracción considerada para la cuantificación que podría realizarse mediante un análisis electroforético, para lo cual será necesario recuperar una gran cantidad de proteína.

Los rendimientos de cápsidas de VAA cuantificados por HPLC estuvo en el orden de 10^{11} partículas/mL para todas las MDI utilizadas. La eficiencia de ensamblaje fue del 2-11.5% y fue mayor a la MDI de 10 UFP/cél. Los rendimientos de proteína ensamblada no presentaron una tendencia relacionada con la MDI utilizada, pero se observaron cambios a diferentes tiempos post-infección para una misma MDI, por lo que el tiempo de cosecha de las partículas deberá ser un parámetro importante a considerar durante la producción de vVAA.

Se observó una disminución en el nivel de expresión de Rep52 conforme aumentó el número de pase de BacRep tanto para infecciones individuales como para coinfecciones con BacCap y BacGFP. Mediante análisis de expresión en placas aisladas se confirmó que la pérdida de expresión en BacRep no se debía a la acumulación de VD sino a pérdida específica de la secuencia de las proteínas Rep, por lo cual será necesario construir nuevos baculovirus para la expresión de estas proteínas.

Durante las coinfecciones se observó que la disminución en la expresión de Rep52 afecta negativamente a la producción de vVAA con capacidad transductora, por tanto la manipulación de la concentración de esta proteína representa una alternativa para incrementar los rendimientos de PT. Durante estos experimentos no fue posible obtener información respecto a la expresión de Rep78 y otros elementos, tales como genomas recombinantes no asociados a baculovirus y genomas encapsidados, lo que imposibilita conocer qué etapa del proceso de formación del vVAA limitó la producción de PT.

A partir de los oligos diseñados para amplificar la región que codifica para Rep78 en el vector pFBDLSR se obtuvo un producto de amplificación de tamaño similar al esperado, cuya secuencia parcial corresponde a la de la proteína Rep78 de VAA-2. Esta secuencia se clonó en el vector pFastBac pero no fue posible confirmar la secuencia completa del casete de expresión. Una vez confirmada la secuencia en el vector será posible llevar a cabo la recombinación con el bácmido mediante el sistema Bac-to-Bac para producir el baculovirus recombinante.

Este trabajo constituye el primer reporte cuantitativo de producción y ensamblaje de proteína VP. Durante la realización del mismo se obtuvo además información que será útil para el desarrollo de estudios posteriores de producción de PT de vVAA-2.

P E R S P E C T I V A S

Aún resulta indispensable obtener información sobre el comportamiento cinético de producción de las proteínas Rep52 y Rep78 en el SCI-BV a fin de proponer estrategias de coinfección para los estudios de replicación y encapsidación de genomas recombinantes de VAA-2, para lo cual será necesario generar nuevos baculovirus que expresen Rep78 y Rep52 de forma independiente y cuya construcción sea estable.

Con base en las observaciones obtenidas en este estudio sobre el efecto de la expresión de Rep52 en los rendimientos de partículas transductoras de vVAA-2 resulta evidente la necesidad de generar conocimiento sobre el efecto de la concentración de Rep78 en la replicación de genomas recombinantes de VAA-2; así como el efecto de las concentraciones de Rep78 y Rep52 en el proceso de encapsidación de genomas durante la producción de partículas transductoras de vVAA. Con esta información podrán proponerse estrategias para incrementar la producción de vVAA-2.

No existe información sobre la localización de proteínas Rep, VP y genomas recombinantes durante su expresión individual o simultánea en células de insecto. La detección *in situ* de estos elementos permitirá conocer su sitio de síntesis y acumulación en células de insecto a lo largo del ciclo de replicación del baculovirus; y lo que resulta aún más interesante, permitirá conocer cómo interaccionan los distintos componentes en el SCI-BV y si resulta viable manipular el tiempo en que se inicia la producción de cada componente para favorecer su interacción.

También resulta necesario caracterizar la composición de las cápsides obtenidas a partir de infecciones con diferentes MDI de BacCap. Por tanto será necesario estudiar la estequiometría de las cápsides de VAA-2 generadas a las distintas MDI y determinar si la estequiometría de producción de las proteínas VP tiene algún efecto sobre la estequiometría de ensamblaje de las partículas. Y si la estequiometría de la cápside, a su vez, influye en la capacidad transductora de la partícula obtenida.

Para resolver la interrogante planteada en el punto anterior será necesario desarrollar métodos que permitan identificar y cuantificar específicamente poblaciones de cápsides con diferente estequiometría en caso de que éstas se encuentren presente en una misma muestra.

BIBLIOGRAFÍA

- Aucoin M. G., Perrier M. and Kamen A. A. (2006) Production of Adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: Optimization of baculovirus concentration ratios. *Biotechnology and Bioengineering*. 95 (6): 1081-1092
- Auricchio A., Hildinger M., O'Connor E., Gao G. P. and Wilson J. M. (2001) Isolation of highly infectious and pure adeno-associated virus type 2 vectors with a single-step gravity-flow column. *Human Gene Therapy*. 12: 71-76
- Berns K. I. (1990) Parvovirus replication. *Microbiological Reviews*. 54 (3): 316-329
- Berns K. I. (1996) *Parvoviridae: the viruses and their replication*: Fields B. N., Knipe D. M. y Howley P. M. et al. (eds). *Fields Virology* 3ra ed. Lippincot-Raven Publishers, Filadelfia. pp 2173-2189
- Beljelarskaya S. N. (2002) A baculovirus expression system for insect cells. *Molecular Biology*. 36 (3): 281-292
- Blissard G. W. (1996) Baculovirus-insect cell interactions. *Cytotechnology*. 20: 73-93.
- Burgess A., Ronning D. R., Perez Z. N., Kotin R. M. and Dyda F. (2004) The nuclease domain of adeno-associated virus Rep coordinates replication initiation using two distinct DNA recognition interfaces. *Molecular Cell*. 13: 403-414
- Chiorini J.A., Yang L., Safer B. and Kotin R.M. (1995) Determination of adeno-associated virus rep68 and rep78 binding sites by random sequence oligonucleotide selection. *Journal of Virology*. 69 (11): 7334-7338
- Daly T. M. (2002) Overview of adeno-associated viral vectors: Heiser W. C. (Ed.) *Methods in Molecular Biology*, Vol. 246: Gene delivery to mammalian cells, Vol 2: Viral gene transfer techniques. Humana Press. pp 157-165
- Ding W., Zhang L., Yan Z. and Engelhardt J. F. (2005) Intracellular trafficking of adeno-associated viral vectors. *Gene Therapy*. 12: 873-880
- Duan D., Sharma P., Yang J., Yue Y., Dudus L., Zhang Y., Fisher K.J. and Engelhardt J.F. (1998) Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *Journal of Virology*. 72 (11): 8568-8577
- Dubielzig R., King J.A., Weger S., Kern A. and Kleinschmidt J.A. (1999). Adeno-associated virus type 2 protein interactions: formation of pre-encapsulation complexes. *Journal of Virology*. 73 (11): 8989-8998
- Fabián-Macedo J. C. (2007) Estudio de las variables de proceso durante la purificación del antígeno de superficie de hepatitis B (AsHB). Tesis de maestría. Programa de maestría en Ciencias Bioquímicas UNAM, Cuernavaca, Morelos.
- Girod A., Wobus C.E., Zádori Z., Ried M., Leike K., Tijssen P., Kleinschmidt J.A. and Hallek M. (2002) The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity. *Journal of General Virology*. 83: 973-978

- Grimm D., Kern A., Pawlita M., Ferrari F.K., Samulski R.J. and Kleinschmidt J.A. (1999) Titration of AAV-2 particles via a novel ELISA: packaging of genomes can limit production of recombinant AAV-2. *Gene Therapy*. 6: 1322-1330
- Grimm D. and Kay M. A. (2003) From virus evolution to vector revolution: Use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Current Gene Therapy*. 3: 281-304.
- Gonçalves M. (2005) Adeno-associated virus: from defective virus to effective vector. *Virology Journal*. 2 (43)
- Hölscher Ch., Kleinschmidt J. A. and Bürkle A. (1995) High level-expression of adeno-associated virus Rep78 or Rep68 protein is sufficient for infectious particle formation by a *rep*-negative AAV mutant. *Journal of Virology*. 69 (11): 6880-6885
- Hoque M., Ishizu K. I., Matsumoto A., Han S. I., Arisaka F., Takayama M., Suzuki K., Kato K., Kanda T., Watanabe H. and Handa H. (1999) Nuclear transport of the major capsid protein is essential for adeno-associated virus capsid formation. *Journal of Virology*. 73 (9): 7912-7915
- Hunter L. A. and Samulski R. J. (1992). Colocalization of adeno-associated virus Rep and Cap proteins in the nuclei of infected cells. *Journal of Virology*. 66 (1): 317-324
- Invitrogen™. Life technologies. (Version M 2002) Bac-N-Blue™ Transfection and Expression Guide. A guide for Baculovirus transfection, expression and purification using the Bac-N-Blue™ baculovirus expression system.
- Invitrogen™. Molecular Probes. Quant-it™ PicoGreen® dsDNA reagent and kits. Product information MP07581.
- Kamen A. A., Bédard Ch., Tom R., Perret S. and Jardin B. (1995) On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus infected and uninfected insect cell bioreactor cultures. *Biotechnology and Bioengineering*. 50: 36-48
- Kay M. A., Liu D. and Hoogerbrugge P. M. (1997) Gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 94: 12744-12746
- King J. A., Dubielzig R., Grim D. and Kleinschmidt J. A. (2001) DNA helicase-mediated packaging of adeno-associated virus type 2 genomes into preformed capsids. *The EMBO Journal*. 20: 3282-3291
- Kohlbrenner E., Aslanidi G., Nash K., Shklyav S., Campbell-Thompson M., Byrne B. J., Snyder R. O., Muzyczka N., Warrington K. H. and Zolotukhin S. (2005) Successful production of pseudotyped rAAV vectors using a modified baculovirus expression system. *Molecular Therapy*. 12 (6): 1217-1225
- Lai Ch. M., Lai Y. K. Y. and Rakoczy P. E. (2002) Adenovirus and adeno-associated virus vectors. *DNA and Cell Biology*. 12: 895-913
- Lewin B. (1997) Recombination. En: *Genes VI*. Oxford University Press and cell press. New York. Pp 531-561
- Li J., Samulski R. J. and Xiao X. (1997) Role of highly regulated expression in adeno-associated virus vector production. *Journal of Virology*. 71 (7): 5236-5243

- Licari P. and Bailey J. E. (1991) Modeling de propulation dynamisc of baculovirus-infected cells: optimizing infection strategies for enhanced recombinant protein yields. *Biotechnology and Bioengineering*. 39: 432-441
- Maranga L., Brazão T. F. and Carrondo M. J. T. (2003) Virus-like particle production at low multiplicities of infection with the baculovirus insect cell system. *Biotechnology and Bioengineering*. 84 (2): 245-253
- Martensen P. M. and Justensen J. (2000) Specific inhibitors prevent proteolytic degradation of recombinant proteins expressed on High Five cells. *BioTechniques*. 30 (4): 782-792
- McCarty D. M., Young S. M. and Samulski R. J. (2004) Integration of adeno-associated virus (AAV) and recombinant AAV vectors. *Annual Reviews in Genetics*. 38: 819-845
- Meghrous J., Aucoin M. G., Jacob D., Chahal P. S., Arcand N. and Kamen A. (2005) Production of recombinant adeno-associated Viral Vectors using a baculovirus/insect cell suspension culture system: from shake to a 20-L bioreactor. *Biotechnology Progress*. 21: 154-160
- Mena J. A. (2004) Estudio del ensamblaje de pseudo-partículas virales de rotavirus en el sistema de células de insecto-baculovirus. Tesis de maestría. Programa de maestría en Ciencias Bioquímicas UNAM, Cuernavaca, Morelos.
- Mena J. A., Ramírez O.T. and Palomares L. A. (2003) Titration of non-occluded baculovirus using a cell viability assay. *Biotechniques*. 34: 260-263
- Mena J. A., Ramírez O.T. and Palomares L. A. (2005) Quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography B*. 824: 267-276
- Miller, L. K. (1996) Insect viruses. En: Fields B. N., Knipe D. M. y Howley P. M. et al. (edis). *Fields Virology* 3ra ed. Lippincot-Raven Publishers, Filadelfia. pp 533-556
- Monahan P. E. and Samulski R.J. (2000) AAV vectors: is clinical success in the horizon?. *Gene Therapy*. 7: 24-30
- Murray S., Nilsson C. L., Hare J. T., Emmet M. R., Korostelev A., Ongley H., Marshall A. G. and Chapman M. S. (2006) Characterization of the capsid protein glycosilation of adeno-associated virus type 2 by high-resolution mass spectrometry. *Journal of Virology*. 80 (12): 6171 – 6176.
- Ni T., Zhou X., McCarty D. M., Zolotukhin I. and Muzyczka N. (1994) *In vitro* replication of adeno-associated virus DNA. *Journal of Virology*. 68 (2): 1128-1138
- O´Reilly D. R., Miller L. K. and Luckow V. A. (1994) *Baculovirus expression vectors: a laboratory manual*. Ed. Oxford University Press. New York. Pp 3-29
- Ortega-García, 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. Programa de maestría en Ciencias Bioquímicas UNAM, Cuernavaca, Morelos.
- Pál-Hajós, J. (2000) Frequency of baculovirus recombination and baculovirus-mediated gene silencing in insects. Tesis doctoral. Eötvös Loránd University, Budapest, Hungary.
- Palomares L. A. y Ramírez O. T. (1996) The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnology*. 22: 225-237

- Palomares L. A. y Ramírez O. T. (2001) El sistema de células de insecto-baculovirus: una alternativa poderosa para la producción de pseudo-partículas virales y otras proteínas recombinantes. *BioTecnología* 6: 16-29
- Palomares L. A., López S., Ramírez O. T. (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. and Ramírez O. T. (2006) Principles and applications of the insect-cell-baculovirus expression vector system: Ozturk S., Hu W.S., eds. *Cell culture technology for pharmaceutical and cellular therapies*. New York: Marcel Dekker.
- Piljman GP, van den Born E, Martens DE, Vlak JM. 2001. *Autographa californica* baculoviruses with large genomic deletions are rapidly generated in infected insect cells. *Virology* 283:132–138.
- Redemann B. E., Mendelson E. and Carter B. J. (1989). Adeno-associated virus Rep protein synthesis during productive infection. *Journal of Virology*. 63 (2): 873-882
- Rohr U. P., Heyd F., Neurkichen J., Wulf M. A., Queitsch I., Kroener-Leux G., Steidl U., Fenk R., Haas R. and Kronenwett R. (2005) Quantitative real-time PCR for titration of infectious recombinant AAV-2 particles. *Journal of Virological Methods*. 127: 40-45
- Rose J. A., Maziol J. V., Inman J. K. and Shatkin A. J. (1971) Structural proteins of adenovirus-associated viruses. *Journal of Virology*. 8 (5): 766-770
- Ruffing M., Zentgraf H. and Kleinschmidt J. A. (1992) Assembly of virus-like particles by recombinant structural proteins of adeno-associated virus type 2 in insect cells. *Journal of Virology*. 66 (12): 6922-6930
- Schmidt M., Afione S. and Kotin R. M. (2000) Adeno-associated virus type 2 Rep78 induces apoptosis through caspase activation independently of p53. *Journal of Virology*. 74 (20): 9441-9450
- Schnepf B. and Clark K. R. (2000) Highly purified recombinant adeno-associated virus vector: Morgan J. R. (ed). *Methods in Molecular Biology: Gene Therapy Protocols* 2a ed. Humana Press. Pp 427-443
- Smith R. H. and Kotin R. M. (1998) The *rep52* gene product of adeno-associated virus is a DNA helicase with 3'-to-5' polarity. *Journal of Virology*. 72: 4874-4881
- Smith R. H., Ding CH. and Kotin R. M. (2003) Serum free production and column purification of adeno-associated virus type 5. *Journal of Virological Methods*. 114: 115-124
- Sommer J. M., Smith P. H., Parthasarathy S., Isaacs J., Vihay S., Kieran J., Powell S. K., McClelland A. and Wright J. F. (2003) Quantification of adeno-associated virus particles and empty capsids by optical density measurement. *Molecular Therapy*. 7 (1): 122-128
- Trempe J. P. and Carter B. J. (1988) Alternate mRNA splicing is required for synthesis of adeno-associated virus VP1 capsid protein. *Journal of Virology*. 62 (9): 3356-3363
- Tsai C.-T., Chan Z.-R., Lu J.-T., Yang D.-G., Lo W.-H. and Hu Y.-C. (2007). Factors influencing the production and storage of baculovirus for gene delivery: an alternative perspective from transducing titer assay. *Enzyme and Microbial Technology*. 40: 1345–1351
- Urabe M., Ding CH. and Kotin R. M. (2002) Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type-2 vectors. *Human Gene Therapy*. 13: 1935-1943

- Urabe M., Nakakura T., Xin K., Obara Y., Mizukami H., Kume A., Kotin R. M. and Ozawa K. (2006) Scalable generation of high-titer recombinant adeno-associated virus type 5 in insect cells. *Journal of Virology*. 80 (4): 1874-1885
- Van Vliet K., Blouin V., Agbandje-McKenna M. and Snyder R. O. (2006) Proteolytic mapping of the adeno-associated virus capsid. *Molecular Therapy*. 14 (6): 809-821
- Wang Z., Zhu T., Qiao Ch., Zhou L., Wang B., Zhang J., Chen Ch., Li J. and Xiao X. (2005) Adeno-associated virus serotype 8 efficiently delivers genes to muscle and heart. *Nature Biology*. 23: 321-328
- Ward P., Urcelay E., Kotin R., Safer B. and Berns K. I. (1994) Adeno-associated virus DNA replication *in vitro*: activation by a maltose binding protein/Rep68 fusion protein. *Journal of Virology*. 68 (9): 6029-6037
- Warrington K. H., Gorbatyuk O. S., Harrison J. K., Opie S. R., Zolotukhin S. and Muzyczka N. (2004) Adeno-associated virus type 2 VP2 capsid protein is nonessential and can tolerate large peptide insertions at its N terminus. *Journal of Virology*. 78(12): 6595-6609
- Wickham T. J., Davis T., Granados R. R., Hammer D. A., Shuler M. L. and Wood H. A. (1991) Baculovirus defective interfering particles are responsible of variations in recombinant protein production as a function of multiplicity of infection. *Biotechnology Letters*. 13 (7): 483-488
- Wistuba A., Weger S., Kern A. and Kleinschmidt J. A. (1995) Intermediates of adeno-associated virus type 2 assembly: identification of soluble complexes containing Rep and Cap proteins. *Journal of Virology*. 69 (9): 5311-5319
- Wistuba A., Kern A., Weger S., Grimm D. and Kleinschmidt J. A. (1997) Subcellular compartmentalization of adeno-associated virus type 2 assembly. *Journal of Virology*. 71 (2): 1341-1352
- Wobus C. E., Hugle-Dorr B., Girod A., Petersen G., Hallek M. and Kleinschmidt J. A. (2000) Monoclonal antibodies against the adeno-associated virus type 2 (AAV-2) capsid: epitope mapping and identification of capsids domains involved in AAV-2-cell interaction and neutralization of AAV-2 infection. *Journal of Virology*. 74 (19): 9281-9293
- Xie Q., Bu W., Bhatia S., Hare J., Somasundaram T., Azzi A. and Chapman M. (2002) The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 99: 10405-10410