



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUIMICAS**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MEDICINA MOLECULAR Y
BIOPROCESOS**

**ESTUDIO CINÉTICO DE PRODUCCIÓN DE
PARTÍCULAS PSEUDO ROTAVIRALES DE TRIPLE CAPA**

T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
MAESTRO EN CIENCIAS**

P R E S E N T A :

**I.B.Q.RICARDO MARTÍN CASTRO
ACOSTA**

**DIRECTORA DE TESIS: DRA. LAURA ALICIA PALOMARES
AGUILERA.**



CUERNAVACA, MORELOS 2008



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 fue realizado en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría de la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera. Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo de la beca de maestría otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT 40376). Además se contó con apoyo de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del proyecto PAPIIT UNAM 206407-3, del CONACYT-Estado de Morelos (MOR-2004-C02-058) y SALUD (CONACYT-2007-C01-69911).

Esta tesis está dedicada a:

A mis padres, Ricardo Castro y Felicitas Acosta, quienes siempre me han brindado su apoyo para realizar lo que me he propuesto y a mis hermanos que son una motivación extra para lograr mis metas.

Agradecimientos

A la Dra. Laura Alicia Palomares Aguilera por su apoyo incondicional, tanto en lo personal como académico, así como su paciencia durante mi formación en el Instituto de Biotecnología-UNAM.

Al Dr. Octavio Tonatiuh Ramírez Reivich por sus sabios consejos y sugerencias.

A los miembros de mi comité tutorial por sus aportaciones y sugerencias durante este proyecto

Dra. Victoria Pando

Dr. Leobardo Serrano

A los miembros del jurado, por sus comentarios y sugerencias

Dra. Laura Alicia Palomares

Dra. Gloria Saab

Dr. Mauricio Trujillo

Dr. Pavel Isa

Dra. Alma Revilla

Por el apoyo técnico recibido durante la ejecución de este proyecto de maestría por las siguientes personas e instituciones:

Unidad de microscopía electrónica del Instituto de Biotecnología.

Dra. Rosana Sánchez y Dra. Guadalupe Zavala por su apoyo en la unidad de microscopía.

Especial agradecimiento a Gloria Villa, Maribel Velasco, Antonio Bolanos e Ing. Jalil Saab de la unidad de Docencia IBT-UNAM, por su apoyo durante mis estudios de maestría.

Gracias a Karin Levy, M. en C. Vanessa Hernández y M. en C. Ruth Pastor, por su apoyo logístico durante mi estancia en el laboratorio.

Gracias a mis queridos compañeros y amigos, Mabel, Adriana, Mauricio Trujillo, Lili, Germán, Antonino, Alvaro, Luis, William, Mauricio, Ricardo, Rene, Jimmy, los integrantes del grupo Galindo, Yovis, Anita, a los del fucho de los viernes, los del voli del sábado y a mis amigos de salud pública y del tenis de mesa.

Tabla de contenidos

Índice de figuras	iv
Índice de tablas	vii
Nomenclatura	viii
Resumen	11
1. Introducción	13
2. Antecedentes	15
2.1. Los rotavirus	15
2.2. Proteínas estructurales de rotavirus	17
2.2.1. VP2	17
2.2.2. VP6	18
2.2.3. VP7	18
2.2.4. VP4	18
2.3. Partículas pseudo virales (PPV)	19
2.4. Sistema de células de insecto baculovirus (SCI-BV)	20
2.4.1. Baculovirus	22
2.4.2. Ciclo de infección de baculovirus	22
2.5. Producción de partículas pseudo rotavirales (PPR)	23
2.6. Diferenciación y cuantificación de PPV	26
2.6.1. Electroforesis capilar	28
3. Justificación y objetivos	30
3.1. Justificación	30
3.2. Objetivo general	30
3.3. Objetivos específicos	30
4. Materiales y métodos	31
4.1. Líneas celulares y técnicas de cultivo	31
4.2. Baculovirus recombinantes	31
4.3. Determinación del título viral	32
4.4. Identificación y cuantificación de proteínas virales	32
4.5. Producción de PPR	33
4.6. Purificación de los estándares de PPR	33

4.6.1. Purificación de tIPPR	34
4.6.1.1. Gradientes CsCl	34
4.6.1.2. Cromatografía de exclusión molecular	34
4.6.2. Purificación de dIPPR	35
4.7. Caracterización y cuantificación de EGFPVP2 por HPLC y espectrofluorímetro	36
4.8. Microscopía electrónica	38
4.9. Desensamblaje de dIPPR y tIPPR	39
4.10. Electroforesis capilar	39
4.10.1. Electroforesis capilar por isoelectroenfoque	39
4.10.2. Electroforesis capilar de zona	40
4.11. Evaluación de metodologías	41
4.11.1. Especificidad	41
4.11.2. Generación de curva estándar y linealidad del sistema	41
4.11.3. Paralelismo	42
4.11.4. Precisión y exactitud	42
4.11.5. Reproducibilidad	42
4.11.6. Límite de detección y cuantificación	42
4.12. Consideraciones matemáticas	43
4.12.1. Cálculo del título viral	43
4.12.2. Cálculo de la velocidad específica de producción de proteína	44
4.12.3. Cálculo de la movilidad electroforética, eficiencia y volumen y volumen de inyección	45
5. Resultados	47
5.1. Producción del estándar de tIPPR	47
5.1.1. Purificación por gradiente de CsCl	48
5.1.2. Purificación por cromatografía de exclusión molecular	54
5.2. Producción y purificación de dIPPR	57
5.3. Diferenciación de dIPPR y tIPPR	59
5.3.1. HPLC	59
5.3.2. Desensamblaje de la dIPPR	60

5.3.3. Electroforesis capilar	61
5.3.3.1. Electroforesis capilar por isoelectroenfoque	62
5.3.3.2. Electroforesis capilar zonal	65
5.3.3.2.1. Capilar recubierto (neutro)	66
5.3.3.2.2. Capilar de sílica fundida	71
5.4. Evaluación del método desarrollado para la cuantificación de tIPPR y dIPPR	78
5.4.1. Especificidad	78
5.4.2. Generación de una curva estándar y linealidad del sistema	78
5.4.3. Paralelismo	81
5.4.4. Precisión y exactitud	82
5.4.5. Reproducibilidad	85
5.4.6. Límite de detección y cuantificación	86
5.5. Cinéticas de producción de tIPPR y dIPPR	88
5.5.1. Cinética de crecimiento de células High Five [®]	88
5.5.2. Cinética de producción en coinfecciones con 3 baculovirus (bacEGFPVP2, bacVP6 y bacVP7)	89
5.5.3. Cinética de producción de dIPPR	95
6. Conclusiones	101
7. Perspectivas	102
8. Referencias	103

Índice de figuras

Figura 2.1.	Esquema estructural de rotavirus	16
Figura 2.2.	Ciclo de replicación de baculovirus en la larva de lepidóptero	23
Figura 2.3.	Microscopía electrónica de partículas pseudo virales de rotavirus	24
Figura 2.4.	Producción de PPR en el sistema de células de insecto baculovirus	25
Figura 2.5.	Cromatograma de HPLC-GP de dIPPR	26
Figura 4.1.	Curva estándar de EGFP en HPLC	37
Figura 4.2.	Curva estándar de EGFP en espectrofluorímetro	38
Figura 5.1.	Cinética de infección de células High Five [®] con 3 baculovirus (bacEGFPVP2, bacVP6 y bacVP7)	47
Figura 5.2.	Western blot de muestras de gradientes de CsCl	49
Figura 5.3.	Cromatograma de la banda 1 del gradiente de CsCl	50
Figura 5.4.	Gradientes de CsCl	51
Figura 5.5.	Tinción con plata de muestras purificadas por gradientes de CsCl	52
Figura 5.6.	Western blot de las muestras purificadas por gradientes de CsCl	53
Figura 5.7.	Microscopías electrónicas de transmisión de muestras de CsCl	53
Figura 5.8.	Cromatograma de la purificación de tIPPR por FPLC	54
Figura 5.9.	SDS-PAGE (10%) de fracciones recolectadas del FPLC	55
Figura 5.10.	Análisis de la muestra purificada por FPLC	55
Figura 5.11.	Cromatograma de HPLC de la muestra purificada por FPLC	56
Figura 5.12.	Cromatograma de la purificación de dIPPR por FPLC	57
Figura 5.13.	Cromatograma de HPLC de la muestra de dIPPR purificada por FPLC	58
Figura 5.14.	Análisis de dIPPR por Western blot y SDS-PAGE	58
Figura 5.15.	Diferenciación de PPR por HPLC	60
Figura 5.16.	Desensamblaje de dIPPR analizado por HPLC	61
Figura 5.17.	Curva de calibración de pI	63
Figura 5.18.	Curva estándar para el cálculo de punto isoelectrico	64

Figura 5.19.	Análisis de tIPPR por ECI	64
Figura 5.20.	Corriente durante corrida por isoelectroenfoque	65
Figura 5.21.	Electroferogramas de dIPPR y tIPPR, pH 8.0.	67
Figura 5.22.	Electroferogramas de dIPPR y tIPPR, pH 7.0.	68
Figura 5.23.	Muestras de PPR analizadas utilizando una solución de fosfatos pH 6.5 a 10 kV en un capilar neutro	69
Figura 5.24.	Muestras de PPR analizadas utilizando una solución de fosfatos pH 5.5 a 25 kV en un capilar neutro	70
Figura 5.25.	Migración de la dIPPR en el capilar de sílica fundida a 25 kV	71
Figura 5.26.	Migración de la tIPPR en el capilar de sílica fundida a 25 kV	72
Figura 5.27.	Análisis electroforético de mezclas de dIPPR y tIPPR en relación 1:2 en capilar de sílica fundida	72
Figura 5.28.	Análisis electroforético de mezclas de dIPPR y tIPPR en relación 1:1 en capilar de sílica fundida	73
Figura 5.29.	Electroferograma de una muestra de cultivo a las 96 h.p.i. purificada por HPLC	74
Figura 5.30.	Electroferograma de una muestra concentrada de cultivo a las 96 h.p.i	75
Figura 5.31.	Electroferograma de muestras de cinética a las 96 h.p.i. concentrada añadiendo PPR a la muestra	76
Figura 5.32.	Cromatograma de la pre-purificación de tIPPR por FPLC	77
Figura 5.33.	Electroferograma de muestras pre-purificadas de tIPPR por FPLC	77
Figura 5.34.	Curva estándar de tIPPR en CZE	79
Figura 5.35.	Curva estándar de dIPPR en CZE	80
Figura 5.36.	Análisis de tIPPR pellet por ECZ	82
Figura 5.37.	Electroferogramas de diluciones de muestras de tIPPR y dIPPR	88
Figura 5.38.	Cinética de crecimiento de células High Five sin infectar	89
Figura 5.39.	Cinética de crecimiento de un cultivo coinfectado con 3 baculovirus, (bacEGFVP2, bacVP6 y bacVP7)	90
Figura 5.40.	Western blot de sobrenadante y pellet lisado de infecciones	91
Figura 5.41.	Análisis por HPLC de muestras de cultivo en la producción	

de tIPPR	92
Figura 5.42. EGFPVP2 en diferentes fracciones de cultivo en la coinfección con 3 baculovirus	93
Figura 5.43. EGFPVP2 en sobrenadante y pellet lisado en la coinfección con 3 baculovirus	93
Figura 5.44. Producción de PPR en coinfecciones con 3 baculovirus	94
Figura 5.45. Cinética de crecimiento de un cultivo coinfectado con 2 baculovirus, bacEGFPVP2 y bacVP6	95
Figura 5.46. Análisis por HPLC de muestras de cultivo en la producción de dIPPR	97
Figura 5.47. EGFPVP2 en diferentes fracciones de cultivo en la coinfección con 2 baculovirus	98
Figura 5.48. EGFPVP2 en sobrenadante y pellet lisado en la coinfección con 2 baculovirus	98
Figura 5.49. Producción de dIPPR en cultivo coinfectado con bacEGFPVP2 y bacVP6	99

Índice de tablas

Tabla 2.1.	Proteínas estructurales mayoritarias de la cápside de rotavirus SA11	16
Tabla 2.2.	Algunas partículas pseudo virales producidas en CI-BV	21
Tabla 2.3.	Algunos virus analizados por E.C.	29
Tabla 5.1.	Área bajo la curva del pico correspondiente a tIPPR a diferentes concentraciones	79
Tabla 5.2.	Área bajo la curva del pico correspondiente a dIPPR a diferentes concentraciones	80
Tabla 5.3.	Análisis de la precisión de la metodología al analizar la muestra de tIPPR	83
Tabla 5.4.	Análisis de la precisión de la metodología en diferentes días de análisis para la muestra de tIPPR	83
Tabla 5.5.	Análisis de la precisión de la metodología al analizar la muestra de dIPPR	84
Tabla 5.6.	Análisis de la precisión de la metodología en diferentes días de análisis para la muestra de dIPPR	84
Tabla 5.7.	Parámetros cinéticas y estequiométricas calculadas en la coinfección con 3 baculovirus (tIPPR) y 2 baculovirus (dIPPR)	100

Nomenclatura

PPV	Partícula pseudo viral
PPR	Partícula pseudo rotaviral
cPPR	Partícula pseudo rotaviral completa
slPPR	Partícula pseudo rotaviral de una capa
dlPPR	Partícula pseudo rotaviral de doble capa
tlPPR	Partícula pseudo rotaviral de triple capa
VP2	Proteína viral 2 de rotavirus
VP6	Proteína viral 6 de rotavirus
VP7	Proteína viral 7 de rotavirus
VP4	Proteína viral 4 de rotavirus
EGFP	Proteína verde fluorescente modificada
EGFPVP2	Proteína de fusión entre EGFP y VP2
SCI-BV	Sistema de células insecto baculovirus
NPV	Nucleopoliedrovirus
AcMNPV	<i>Autographa californica</i> multinuclearpoliedrovirus
bacEGFPVP2	Baculovirus que codifica para la proteína EGFPVP2
bacVP6	Baculovirus que codifica para la proteína VP6
bacVP7	Baculovirus que codifica para la proteína VP7
MDI	Multiplicidad de infección
HPLC	Cromatografía líquida de alta presión
SA11	Cepa de rotavirus de mono
RF	Cepa de rotavirus bovino
OSU	Cepa de rotavirus porcino
EC	Electroforesis capilar
ECI	Electroforesis capilar por isoelectroenfoque
ECZ	Electroforesis capilar zonal
pI	Punto isoelectrónico
q _p	Velocidad específica de producción de proteína
q _{PPR}	Velocidad específica de producción de PPR

$q_{EGFPVP2}$	Velocidad específica de producción de EGFPVP2
$q_{EGFPVP2d}$	Velocidad específica de degradación de EGFPVP2
$q_{EGFPVP2r}$	Velocidad específica de producción de EGFPVP2 retenida en fragmentos celulares
μ	Velocidad específica de crecimiento
β	Velocidad específica de producción de proteína
X_v	Concentración celular viable
X_t	Concentración celular total
t	Tiempo
h	Hora
h.p.i.	Horas post infección
μ_{ef}	Mobilidad electroforética
μ_{app}	Mobilidad aparente
μ_{FEO}	Mobilidad del flujo electrosmótico
FEO	Flujo electrosmótico
L_d	Longitud efectiva del capilar
L_t	Longitud total del capilar
V	Voltaje
E	Campo eléctrico
N	Número de platos teóricos
$W_{0.1}$	Ancho del pico al 10% de la altura de pico
$a_{0.1}$	Ancho de la primera mitad del pico al 10% de la altura de pico
$b_{0.1}$	Ancho de la segunda mitad del pico al 10% de la altura de pico
t_m	Tiempo de migración
High Five [®]	Línea celular de <i>Trichoplusia ni</i>
Sf9	Línea celular de <i>Spodoptera frugiperda</i>
SF900II	Medio químicamente definido para el cultivo de células de insecto (Invitrogen)
YM	Anticuerpo policlonal de conejo anti-proteínas estructurales de rotavirus
Ufp	Unidades formadoras de placa
FPLC	Cromatografía líquida de baja presión

λ_{ex}	Longitud de onda de excitación
λ_{em}	Longitud de onda de emisión
ICH	International Conference of Harmonisation of technical requirements for registration of pharmaceuticals for human use

Resumen

Los rotavirus son la principal causa de diarrea en niños menores de cinco años, ocasionando aproximadamente 600,000 muertes al año. Una alternativa para prevenir la infección por rotavirus es la vacunación. Entre los candidatos a vacunas están las partículas pseudo virales (PPV). Las PPV son cápsides virales que no contienen el material genético del virus, ya que se producen por la expresión simultánea de la o las proteínas estructurales virales. La producción de partículas pseudo rotavirales (PPR) implica la expresión simultánea de 4 proteínas estructurales, o varias combinaciones de ellas. En este trabajo expresamos las proteínas estructurales EGFPVP2 (proteína de fusión EGFP-VP2), VP6 y VP7 para producir la PPR de triple capa (tIPPR) en el sistema de células de insecto baculovirus. El objetivo fue desarrollar metodologías que permitan diferenciar y cuantificar PPR de doble y triple capa con el fin de determinar parámetros cinéticos de producción. La diferenciación de las PPR de doble y triple capa e intermediarios en muestras de cultivo (proteínas no ensambladas e intermediarias de tIPPR) es necesaria para proponer estrategias de producción. Es importante determinar la concentración de los diferentes intermediarios en el cultivo así como de PPR de interés para determinar las condiciones de cultivo que resultarán en los mayores rendimientos de la PPR de interés.

Se implementó la cromatografía de permeación en gel para purificar las tIPPR, lo que nos proporcionó material de trabajo con una pureza por arriba del 95% con base en macroestructuras ensambladas. Las muestras purificadas de PPR fueron utilizadas para implementar la electroforesis capilar zonal. Se utilizó para diferenciar entre dIPPR y tIPPR. Utilizando los criterios definidos por la International Conference on Harmonization of Technical Requirements for Registration of Pharmaceutical for Human Use, se demostró que esta metodología permite determinar de una manera reproducible, exacta y precisa la relación entre dIPPR y tIPPR en muestras purificadas, lo que permitirá caracterizar las preparaciones de PPR y realizar una mejor evaluación de su capacidad como inmunógenos. El coeficiente de variación de las movilidades electroforéticas fue de 1.3 y 1.4% para la dIPPR y tIPPR respectivamente, y en cuanto a la cuantificación de la concentración de dIPPR y tIPPR fue de 1.4 y 2.6%, respectivamente. También, se determinaron los límites de detección (1.41 $\mu\text{g/mL}$ para tIPPR y 1.80 $\mu\text{g/mL}$ para dIPPR) y cuantificación (4.10 $\mu\text{g/mL}$ para tIPPR y 2.11 $\mu\text{g/mL}$ para dIPPR).

Se analizaron cinéticas de producción de PPR coinfectando con 2 baculovirus (bacEGFPVP2 y bacVP6) y coinfectando con 3 baculovirus (bacEGFPVP2, bacVP6 y bacVP7) cultivos de células de insecto. Se observó que en los cultivos coinfectados con dos baculovirus la proteína EGFPVP2 se degrada 22.6 veces más que en la coinfección con 3 baculovirus, aunque la producción de EGFPVP2 fue solamente 5 veces mayor en la coinfección con 2 baculovirus. Esto indica que la presencia de VP7 podría incrementar la eficiencia de ensamblaje de las proteínas en PPR. La eficiencia de ensamblaje repercute directamente en la degradación de EGFPVP2 (10% de ensamblaje de EGFPVP2 en PPR y 25% de ensamblaje de EGFPVP2 en PPR). También se observó que la mayor cantidad de PPR en el cultivo infectado con 3 baculovirus es transportado al sobrenadante (60%), mientras que las PPR en el cultivo infectado con 2 baculovirus permanecen en el interior de la célula (80%). Esto indica que las tIPPR se acumulan preferentemente en el sobrenadante del cultivo.

En este trabajo fue posible implementar la ECZ con la que por primera vez se logró diferenciar entre la dIPPR y tIPPR en muestras purificadas y conocer la composición exacta de estas muestras. Además, por primera vez se evalúa la eficiencia de ensamblaje de las PPR producidas en cultivos coinfectados con 3 baculovirus (producción de tIPPR), así como la concentración de PPR (dIPPR y tIPPR) presente en el cultivo.

Capítulo 1

Introducción

Las partículas pseudo virales (PPV) están conformadas por proteínas virales que al ser expresadas en un sistema heterólogo, se ensamblan en una cápside idéntica al virus nativo. Entre algunas de sus aplicaciones se encuentran la producción de biosensores, nanotecnología, terapia génica, estudios de ciencia básica y principalmente la producción de vacunas. Nuestro grupo de investigación ha centrado sus esfuerzos en estudiar el proceso de producción de las PPV, en un caso más específico, las partículas pseudo rotavirales (PPR). Los rotavirus son la principal causa de diarrea en niños menores de 5 años, y provocan aproximadamente 611,000 muertes al año (Parashar et al., 2006). Los rotavirus son virus icosaédricos conformados por las proteínas VP2, VP6 y VP7, que conforman una cápside de 3 capas concéntricas, y VP4 que forma espículas que sobresalen del virus (Estes y Cohen, 1989). Estudios realizados por O'Neil y colaboradores (1997) demostraron que las PPR tienen una alta capacidad inmunogénica al encontrar que las dlPPR producen una protección de 92% cuando son utilizadas para inmunizar ratones retados con virus nativo, mientras las tlPPR inducen una protección alrededor del 100%. Sin embargo, existen otros reportes también en ratones y otros modelos animales en los que no se obtiene una protección igual de eficiente (Ciarlet et al., 1998; Yuan et al., 2000; Iosef et al., 2002; Bertolotti-Ciarlet et al., 2003).

La PPR de doble capa (dlPPR) está compuesta por las proteínas VP2 y VP6 y la de triple capa (tlPPR) por VP2, VP6 y VP7 (Crawford et al, 1994; Jiang et al., 1998). Nuestro grupo ha trabajado ya por varios años en la producción de dlPPR y determinado los factores que afectan su ensamblaje y producción (Palomares et al., 2002; Mena, 2004; Mena et al., 2005; Mena et al., 2006; Mena et al., 2007; Mena, 2007). La producción de PPR es compleja y poco eficiente, por lo tanto es importante contar con estrategias racionales de producción de tlPPR que permitan incrementar la productividad. La producción de PPR implica la expresión simultánea de 4 proteínas estructurales (VP2, VP6, VP7 y VP4), las que deben estar en un ambiente adecuado para que se lleve a cabo

el ensamblaje (Crawford et al., 1994). Es necesario conocer el comportamiento cinético durante la producción de las diferentes proteínas de la PPR para desarrollar estrategias eficaces de producción. La diferenciación y cuantificación es otro punto importante, ya que no se cuenta con un método adecuado que permita diferenciar entre las tIPPR y posibles intermediarios en línea.

En este proyecto se desarrolló un método para diferenciar y cuantificar tIPPR y dIPPR, con el propósito de estudiar las cinéticas de producción y ensamblaje de las proteínas VP2, VP6 y VP7 de rotavirus en la coinfección con 2 y 3 baculovirus con el fin de sentar las bases para desarrollar estrategias racionales de producción de estas estructuras.

Capítulo 2

Antecedentes

2.1. LOS ROTAVIRUS

Los rotavirus pertenecen a la familia *Reoviridae* y son la causa más importante de muerte por diarrea en niños menores de 5 años. Estudios publicados entre 1986 y 1999 arrojaron que los rotavirus fueron la causa del 22% de hospitalizaciones por diarrea. Ésta proporción se incrementó a 34% del 2000 al 2004, cuando se produjeron 611,000 muertes por año (Parashar et al., 2006). Los rotavirus son virus cuyo genoma está formado por 11 segmentos de ARN de doble cadena, con un total de 18.5 Kpb los cuales codifican 6 proteínas estructurales y 6 proteínas no estructurales. Las cápsides rotavirales tienen un diámetro de 75 nm aproximadamente, con una geometría icosaédrica y simetría T= 13 (número de triangulación). El ARN y 2 proteínas estructurales (VP1 y VP3) están confinados en el interior de la cápside de tres capas concéntricas formadas por las proteínas VP2, VP6, VP7 y VP4 (Estes y Cohen, 1989) (Tabla 2.1). La formación de la nucleocápside (50 nm de diámetro) se da por la interacción de 120 unidades de VP2 (60 dímeros de VP2), siendo esta indispensable para el ensamblaje de la cápside completa (Estes y Cohen, 1989; Zeng et al., 1998; Blut et al., 1999). Las proteínas VP1 y VP3 se encuentran dentro de la nucleocápside, y su función principal no es estructural sino la de ARN polimerasa y guanilil transferasa, respectivamente. Se ha comprobado que la ausencia de las proteínas VP1 y VP3 no afecta la estabilidad de la nucleocápside (Lawton et al., 1996). La proteína VP6 conforma la segunda capa de proteína de la cápside y es además, la proteína más abundante en la misma. Se encuentra formando 260 trímeros (780 moléculas), dando lugar a una estructura de 70 nm de diámetro (Gilbert et al., 2001; Mathieu et al., 2001).

La tercera capa está conformada por la proteína glicosilada VP7 (260 trímeros), que es dependiente de calcio para su ensamblaje y estabilidad del rotavirus (Estes y Cohen, 1989; Ruiz et al., 1996). La proteína más externa es VP4, esta proteína se ensambla en

trímeros que conforman las espículas que sobresalen aproximadamente 12 nm de la cápside viral (Prasad et al., 1990; Yeager et al., 1994; Dormitzer et al., 2004). Se ha demostrado que la capa externa de la cápside conformada por las proteínas VP7 y VP4 permite la interacción con la célula huésped al estar vinculadas con el reconocimiento y penetración del virus (Ruiz et al., 1994; López y Arías, 2007) (Fig. 2.1.).

Tabla 2.1. Proteínas estructurales mayoritarias de la cápside de rotavirus SA11 (Estes y Cohen, 1989)

Proteína	PM (kDa)	# Moléculas/virus	% Proteína total en la cápside (p/p)
VP2	102	120 (60 dímeros)	13
VP6	46	780 (260 trímeros)	39
VP7	37	780 (260 trímeros)	31
VP4	86	180 (60 trímeros)	17

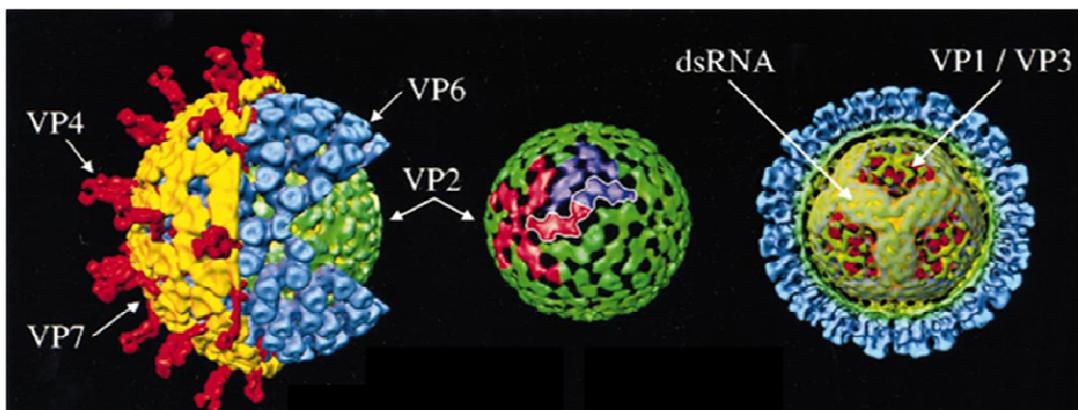


Figura 2.1. Esquema estructural de rotavirus. (Tomado de Patton y Spencer 2000)

Los rotavirus se clasifican principalmente en grupos y subgrupos, esto basado en la inmunoreactividad de VP6 (grupos A-E). El grupo A es el de mayor importancia, ya que es el principal responsable de las infecciones por rotavirus en humanos. Dentro de estos grupos existen diferentes genotipos de acuerdo a la secuencia nucleotídica de las proteínas VP4 (genotipo P) y VP7 (genotipo G). Hasta la fecha, se han caracterizado 27 genotipos P y 15 genotipos G (Khamrin et al., 2007). Los genotipos que se incluyen en partículas pseudo rotavirales son importantes, ya que se ha encontrado que la protección cruzada entre serotipos es limitada (Perez-Vargas et al., 2006; Kapikian y Hoshino, 2007).

2.2. PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DE ROTAVIRUS

2.2.1. VP2

Es la proteína que conforma la cápside interna del virus. VP2 está compuesta por 880 aminoácidos, posee dos zíppers de leucina entre los aminoácidos 536 y 686 que están implicados en la dimerización de VP2 y la unión a ácidos nucleicos (Estes y Cohen, 1989; Labbé et al., 1991). Esta proteína presenta la propiedad de autoensamblarse en estructuras similares a la nucleocápside viral cuando es expresada en sistemas heterólogos, lo que sugiere que VP2 no depende de otros componentes virales (ARN, otras proteínas estructurales y no estructurales) para formar la capa interna de la cápside (Labbé et al., 1991).

Con la finalidad de entender el comportamiento en la producción de VP2 y así poder explicar diversos mecanismos de replicación y ensamblaje, Charpilienne y colaboradores (2002) construyeron un baculovirus que codifica para la proteína VP2 fusionada con la proteína verde fluorescente (EGFP). Al expresar esta proteína en células de insecto se observó y demostró que tenía las mismas características de autoensamblaje que VP2 nativa. Además, con la ayuda de esta proteína de fusión se ha logrado analizar cinéticas de producción de dPPR, ya que la proteína EGFP ensamblada en la cápside tiene el mismo coeficiente de extinción molar que la proteína no ensamblada (Charpilienne et al., 2001; Mena, 2004; Mena et al., 2005).

2.2.2. VP6

Esta proteína es la más abundante de la cápside de rotavirus. Está compuesta por 397 aminoácidos y juega un papel importante en la estructura del virus, ya que interacciona con la proteína VP2 hacia el interior de la cápside y hacia el exterior con las proteínas VP7 y VP4 en la capa externa del virus (Estes y Cohen, 1989; Yeager et al., 1994). VP6 forma trímeros espontáneamente, estos trímeros son altamente estables a concentraciones de calcio menores de 10 mM y zinc mayores de 6 mM (Lepault et al., 2001; Mathieu et al., 2001; Erk et al., 2002). VP6 tiene la capacidad de ensamblarse en diferentes

estructuras dependiendo de la fuerza iónica y el pH del buffer como son túbulos de diversos diámetros y longitudes y esferas, cuando no está presente VP2 (Sabara et al., 1991; Lepault et al., 2001; Mena et al., 2006). Cuando VP2 está presente, éstas (VP2 y VP6) se ensamblan formando la dIPPR (Crawford et al., 1994).

2.2.3. VP7

VP7 es una N-glicoproteína de 326 aminoácidos que contiene oligosacáridos del tipo de alta manosa (Kabcenell et al., 1988; Estes y Cohen, 1989), lo que indica que VP7 no es procesada en el retículo endoplásmico al aparato de Golgi, donde los N-Glicanos de alta manosa son modificados para convertirlos en oligosacáridos complejos. Aún no se ha logrado determinar con precisión la función específica de VP7 en la cápside. Se ha observado que VP7 tiene dominios de unión a la célula huésped, aunque no se conoce el mecanismo de acción, y también se ha observado que la ausencia de VP7 en la cápside provoca pérdida en la infectividad (Dyall-Smith et al., 1986; Estes y Cohen, 1989; Crawford et al., 1994). El ensamblaje de VP2, VP6 y VP7 da lugar a la formación de la cápside viral de tres capas concéntricas. El ensamblaje es altamente dependiente de calcio para su conformación y estabilidad (Ready et al., 1988; Ruiz et al., 1996). VP7 tiene la capacidad de formar trímeros y este fenómeno requiere calcio ($\geq 5\text{mM}$). Además, se ha observado que la formación de trímeros es indispensable para el ensamblaje de la tIPPR (Trask y Dormitzer, 2006). Además del trabajo de Trask y Dormitzer (2006) en el que analizan diferentes parámetros que afectan el ensamblaje de las cápsides de rotavirus, no existen reportes acerca del efecto de diferentes concentraciones de calcio sobre el ensamblaje de VP7 en tIPPR, aunque algunos han determinado las concentraciones de calcio necesarias para mantener estables las tIPPR observándose que son dependientes de cada cepa y van desde 20 nM hasta 600 nM (Ruiz et al., 1996).

2.2.4. VP4

Es la proteína más externa de la cápside viral que conforma las espículas características de rotavirus con las cuales el virus se une e inicia su ciclo infectivo en las células

huésped. VP4 contiene 776 aminoácidos, y al ser tratada con tripsina sufre un corte que resulta en dos fragmentos denominados VP8, de 231 aminoácidos, y VP5, de 529 aminoácidos. Se ha observado que este corte produce un incremento en la capacidad infectiva del virus (Ruiz et al., 1994; Estes, 2001). Los mecanismos de reconocimiento y penetración del virus aún no se han elucidado por completo, aunque se han propuesto modelos que proponen tanto la penetración del virus a la célula por endocitosis mediada por receptores y por penetración directa (Méndez et al., 1999; López y Arías, 2007, Isa et al., 2008). Éstas 60 espículas que sobresalen de la cápside viral aproximadamente 12 nm, tienen un arreglo trimérico (Dormitzer et al., 2004; Yoder y Dormitzer, 2006). La proteína VP4 de algunas cepas tiene la capacidad de aglutinar eritrocitos al interactuar con ácidos siálicos presentes en superficie de la célula huésped (Estes y Cohen, 1989).

Aún no se conoce con exactitud cuál es el primer paso en el ensamblaje de la tercera capa de los rotavirus, aunque un ensayo *in vitro* demostró que se incrementa la producción de cápsides virales infectivas cuando se adiciona primero al medio de reacción VP4 que VP7, sugiriendo que este sería el orden de ensamblaje *in vivo* (Trask y Dormitzer, 2006). VP4 tiene sitio de interacción con ambas con VP6 y VP7 (Pesavento et al., 2006).

2.3. PARTICULAS PSEUDO VIRALES (PPV)

Las PPV se producen al expresar las proteínas estructurales del virus de interés en un sistema heterólogo, dichas proteínas se ensamblan en estructuras idénticas a los virus nativos pero sin el material genético, por lo que no son infecciosas. Una de las características más importantes de estas estructuras es que desencadenan una fuerte respuesta inmune humoral y una poderosa respuesta celular, esto ya que se ha observado que estas partículas estimulan una potente respuesta mediada por células B, una activación de la inducción por CD8⁺ y una eficiente activación de las células presentadoras de antígenos (Ruedl et al., 2002; Lenz et al., 2003; Noad y Roy, 2003; Ye et al., 2006). La capacidad de las PPV de generar una respuesta inmune sin tener las propiedades infecciosas y replicativas de los virus representa una ventaja para el diseño eficiente de vacunas más seguras (Boisgerault et al., 2002; Blutt et al., 2005). Existen una gran cantidad de estudios en los que se demuestra la capacidad inmunogénica de estas

partículas (O'Neal et al., 1997; Madore et al., 1999; Boisgerault et al., 2002; Blutt et al., 2005). O'Neil y colaboradores (1997) observaron que la inoculación en ratones con dIPPR y tIPPR resulta en una protección de 92% con dIPPR y de ~100% con tIPPR al retar con rotavirus silvestres. Otras posibles aplicaciones de las PPV son el transporte de materiales en nanotecnología y en ciencia básica (Douglas y Young, 1998; Goicochea et al., 2007). Los diversos análisis que se han realizado de la capacidad inmunogénica de las PPV han utilizado partículas parcialmente purificadas por gradientes de CsCl. Estas preparaciones contienen una gran cantidad de intermediarios y proteínas virales sin ensamblar (Mena et al., 2005; Reimerink et al., 2007). Esto impide determinar con exactitud la respuesta inmune que generan las PPV completas *per se*, además que es difícil obtener lotes reproducibles. Estos lotes al no estar 100% purificados (100% cápsides) ocasionan que los resultados no se deban atribuir necesariamente a las PPR ensambladas, si no a una mezcla de cápsides ensambladas y proteínas sin ensamblar con lo que no se evalúa directamente la eficiencia de las cápsides como inmunógenos.

El ensamblaje de las PPR no requiere de proteínas no estructurales o ácidos nucleicos para mantener la estabilidad de las cápsides (Crawford et al., 1994; Trask y Dormitzer, 2006). La capacidad de ensamblaje de las proteínas virales demuestra que bajo ciertas condiciones cada una de las proteínas expresadas tiene la capacidad de ensamblarse en estructuras más complejas. Las cápsides se ensamblan en condiciones que propician la interacción entre las proteínas y mantienen estas interacciones estables. Estas interacciones son las fuerzas de van der Waals, los puentes de hidrógeno, interacciones hidrofóbicas y puentes disulfuro. Todas estas interacciones son dependientes de la fuerza iónica, el pH, el potencial redox y la concentración de ciertos metales (Phelps et al., 2000; Ceres y Zlotnick, 2002; Zlotnick, 2003).

2.4. SISTEMA DE CÉLULAS DE INSECTO BACULOVIRUS (CI-BV)

El CI-BV es una herramienta útil para la producción de proteínas heterólogas debido a su gran versatilidad. Permite la inserción de varios genes y así, expresar varias proteínas al mismo tiempo, con una alta productividad de proteína heteróloga (20-250 veces más que en células de mamífero) y con la capacidad de llevar a cabo modificaciones

postraduccionales complejas (Roy et al., 1997; Berger et al., 2004; Palomares et al., 2006). Por esto es el sistema más empleado en la producción de partículas pseudo virales que requieren la expresión simultánea de varias proteínas virales. La producción de PPV en este sistema consiste en la infección de un cultivo de células de insecto con uno o varios baculovirus recombinantes (vectores) que contengan los genes de la o las proteínas virales de interés (Pattenden et al., 2005).

En este sistema se pueden alcanzar concentraciones de proteína heteróloga por arriba de 1g/L. Además, se puede trabajar a altas concentraciones celulares en cultivo por lote (10×10^6 cel/mL) y lote alimentado (50×10^6 cel/mL). Más de 500 proteínas han sido producidas en este sistema, además de un número importante de PPV (Tabla 2.2.) (Noad y Roy, 2003; Palomares et al., 2006).

Tabla 2.2. Algunas partículas pseudo virales producidas en CI-BV

Partícula pseudo viral	# proteínas en la cápside
Hepatitis B	1
Hepatitis C	1
HIV	1
Norwalk	1
Rotavirus	4
Papilomavirus	1
Parvovirus canino	1
Parvovirus B19	1
Poliovirus	4
Fiebre aftosa	4

(Noad y Roy , 2003)

En cuanto a las modificaciones postraduccionales que en este sistema se pueden llevar a cabo están la N y O-Glicosilación, fosforilación, alquilación de ácidos grasos, amidación, entre otras (Kost et al., 2005; Palomares et al., 2006). Por esto el sistema de CI-BV es uno de los más utilizados tanto en la producción de proteínas terapéuticas, como de partículas virales que están compuestas de más de una proteína y además, requieren modificaciones postraduccionales (Pattenden et al., 2005; Palomares et al., 2006).

2.4.1. BACULOVIRUS

El baculovirus pertenece a la familia *Baculoviridae* y es un virus de doble cadena de ADN circular rodeado por una cápside proteica, la cual tiene un diámetro de 40-50 nm y una longitud de 200-400 nm. Es un virus lítico el cual se divide en dos géneros: los granulovirus y los poliedrovirus. Ambos se caracterizan por estar protegidos por una matriz que en el caso de los granulovirus está compuesta por granulina, mientras que en los poliedrovirus la matriz está formada por otra proteína llamada poliedrina (29kDa). El baculovirus solamente infecta artrópodos, por lo que no representa un riesgo para los mamíferos (Palomares et al., 2006).

Durante las pasadas décadas, los baculovirus han sido utilizados como una herramienta importante en la producción de proteínas heterólogas en células de insecto. El Nucleopoliedrovirus (NPV) de *Autographa californica* (AcMNPV) es el baculovirus más empleado ya que su rango de huéspedes es más amplio que el de otros baculovirus. Para la construcción de baculovirus recombinantes se reemplaza el gen de la poliedrina (*polh*) o el de *p10* por el gen de interés. Se han escogido estos promotores porque la producción de ambas proteínas representa entre el 30 y 50% de la proteína celular total en células infectadas (Palomares et al., 2006).

2.4.2. CICLO DE INFECCIÓN DEL BACULOVIRUS

El ciclo de infección del baculovirus está dividido en 4 etapas: fase temprana inmediata (α), fase temprana (β), fase tardía (γ) y fase muy tardía (δ). El reconocimiento y entrada del baculovirus requiere de la glicoproteína gp64 la cual es responsable de la interacción con los receptores y de la fusión con la membrana del endosoma (Jarvis y García., 1994, Markovic et al., 1998). En la fase α se lleva a cabo la migración de los viriones al núcleo de la célula e inicio de la transcripción. En la fase temprana (4-7 horas post infección, h.p.i.), el baculovirus empieza a controlar los procesos de replicación celular, dirigiéndolos hacia los procesos de transcripción, traducción y replicación del virus. En la fase tardía (7-20 h.p.i), se lleva a cabo la replicación viral y también se producen los virus no ocluidos (sin capa de poliedrina) que son liberados para infectar otras células

(infección secundaria). Finalmente la fase muy tardía (20-24 h.p.i) es la de mayor interés del sistema CI-BV, ya que en esta fase se expresan los genes (*polh* y *p10*), ya que estas proteínas no son esenciales para la replicación *in vitro* del baculovirus y además representan un gran porcentaje de las proteínas virales producidas (Fig. 2.2.) (Smith et al., 1983; O'Reilly et al., 1994; Miller et al., 1996; Palomares et al., 2006).

Un inconveniente al utilizar estos promotores es que al darse la expresión de la proteína heteróloga de forma muy tardía puede haber proteasas que degradan la proteína de interés (Palomares et al., 2006).

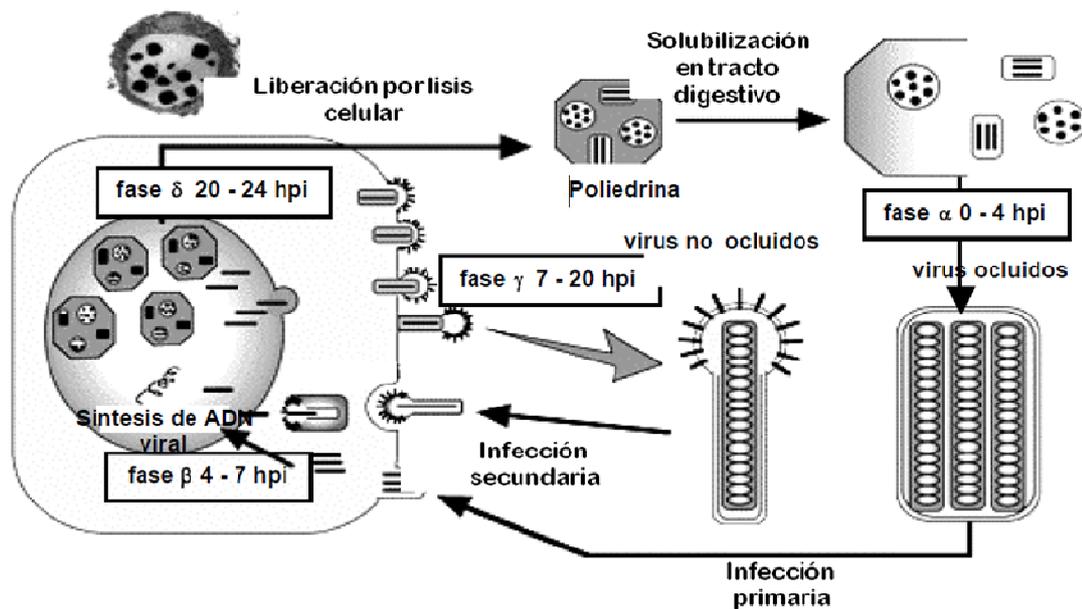


Fig.2.2. Ciclo de replicación de baculovirus en la larva de lepidóptero. Tomada de Delgado.

2.5. PRODUCCIÓN DE PARTÍCULAS PSEUDO ROTAVIRALES (PPR)

En el CI-BV es posible obtener PPR de mono, doble o triple capa, dependiendo si se expresa solo una proteína con un solo baculovirus heterólogo o la expresión de varias proteínas, al coinfectar con más de uno, o con un solo baculovirus policistrónico que contenga los genes de varias proteínas estructurales (Palomares et al., 2002; Vieira et al., 2005). De esta forma, la expresión de VP2 resulta en la producción de PPR de una sola capa (slPPR), la expresión simultánea de VP2 y VP6 en la de doble capa (dlPPR), la de

VP2, VP6 y VP7 en la de triple capa (tIPPR) y la de las 4 proteínas en la cPPR. En la producción de cada cápside pueden existir intermediarios como la sIPPR, dIPPR, tIPPR, cPPR y proteínas sin ensamblar (Labbé et al., 1991; Crawford et al., 1994) (Fig 2.3.). La mayoría de las PPR producidas son estables con excepción de aquella conformada por las proteínas VP6 y VP7, que se ha observado se desensamblan rápidamente. Se han evaluado las características inmunogénicas de las diferentes PPR en diferentes modelos animales y se ha observado que la mayor protección es causada por las cPPR (Sabara et al., 1991; Crawford et al., 1994; Gilbert y Greenberg, 1997; Gilbert et al., 2001; Blutt et al., 2004).

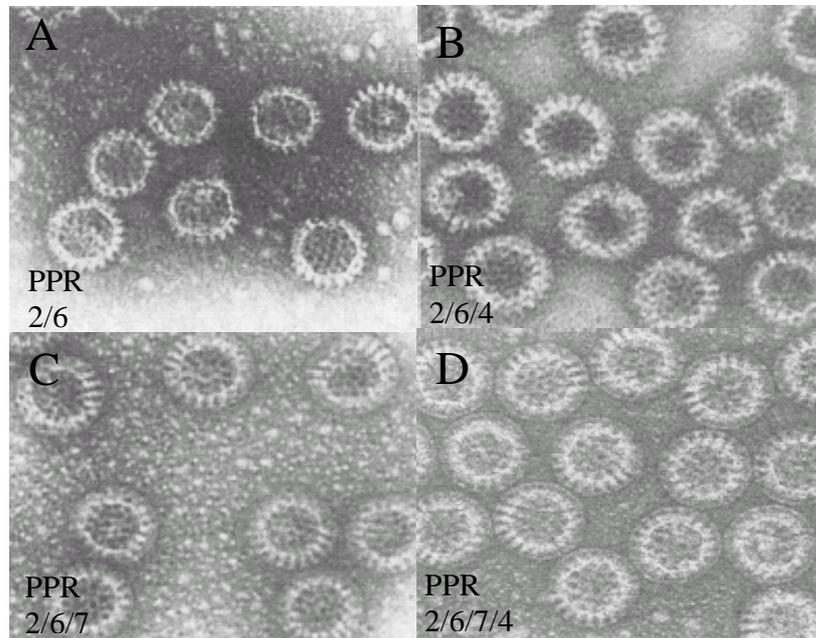


Figura 2.3. Microscopía electrónica de partículas pseudo rotavirales: a) la PPR compuesta por las proteínas VP2 y VP6 (70 nm), b) la compuesta por VP2, VP6 y VP4 (70 nm), c) la compuesta por VP2, VP6 y VP7 (75 nm) d) la partícula pseudo viral completa compuesta por VP2, VP6, VP7 y VP4 (75 nm) (Tomado de Crawford et al., 1994).

La producción de la PPR es una tarea complicada, ya que implica la expresión simultánea de las 4 proteínas estructurales y su ensamblaje para la formación de la cPPR. Es necesario además, expresar las diferentes proteínas virales en una relación adecuada, ya que se ha determinado que los rendimientos de ensamblaje de la dIPPR son bajos, debido a que se requiere la sobre-expresión de ambas proteínas (VP2 y VP6), no necesariamente en la relación estequiométrica presente en la PPR (Mena, 2007). Además, al producir la

tIPPR se tendrán intermediarios como la dIPPR y proteínas sin ensamblar, las que podieran interferir en la cuantificación de estas estructuras (Fig. 2.4).

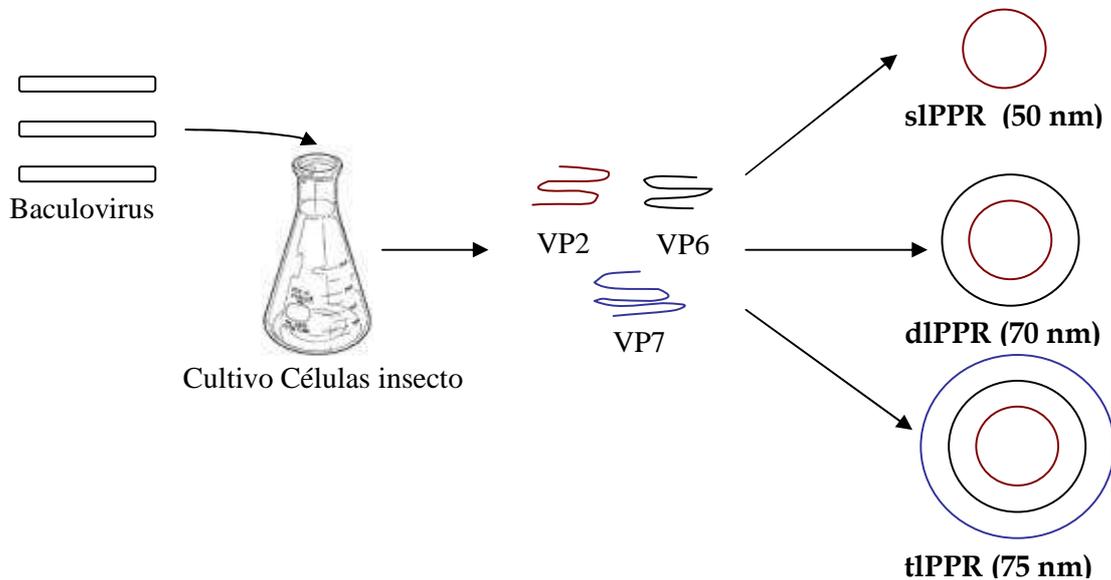


Figura 2.4. Producción de PPR en el sistema de células de insecto baculovirus. Todos los elementos a la izquierda del matraz pueden acumularse en una coinfección.

El ensamblaje las cPPR es aún incierto, aunque existen reportes sobre el ensamblaje de dIPPR *in vivo* (Mena, 2007) y cPPR *in vitro* (Trask y Dormitzer, 2006). Trask y Dormitzer (2006) realizaron el ensamblaje de cápsides completas utilizando como templado virus nativo de doble capa e incorporando VP4 y VP7 producida heterológamente, y comentan que la formación de los trímeros de VP7 es un prerequisite para su unión a la dIPPR, además, que factores como el pH y la temperatura afectan el ensamblaje considerablemente. La formación de los trímeros de VP7 es dependiente de calcio (Maass y Atkinson, 1990; Dormitzer et al., 2000; Trask et al., 2006) y una nula concentración de calcio en el buffer induce el desensamblaje de la cPPR o tIPPR en dIPPR, lo que provoca una disminución en la capacidad infecciosa del virus (Ruiz et al., 2000).

2.6. DIFERENCIACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PPR

Es indispensable para el desarrollo de procesos de producción eficientes de PPR, la diferenciación de los distintos intermediarios y su cuantificación. Es necesario separar la PPR de interés de los posibles intermediarios y otras macroestructuras, como sería el mismo baculovirus. El tener una relación real de las partículas presentes en una muestra y el conocer la concentración presente de las mismas, nos permitirá evaluar mejor vacunas potenciales, así como productos ya aprobados. Además, esto nos permitirá analizar de manera confiable y directa la producción de estas estructuras con la finalidad de seguir cinéticas de producción y optimizar el proceso de producción de PPR.

La diferenciación de las PPR ha sido un tema abordado solamente por unos cuantos grupos. Mena y colaboradores (2005) desarrollaron una metodología utilizando cromatografía de alta presión (HPLC) y columnas de exclusión molecular Ultrahydrogel 2000 y 500 (Waters, USA) instaladas en serie (tamaño de poro de 200 nm y 50 nm, respectivamente) para diferenciar las dIPPR de intermediarios y cuantificarlas mediante un detector de fluorescencia (analizando la proteína de fusión EGFPVP2). Mediante esta metodología fue posible diferenciar baculovirus de dIPPR, y de proteínas sin ensamblar (Fig. 2.5). Así, fue posible analizar cinéticas de producción de dIPPR y con base en ello se lograron determinar las mejores condiciones para su producción y ensamblaje (Mena et al., 2005; Mena, 2007).

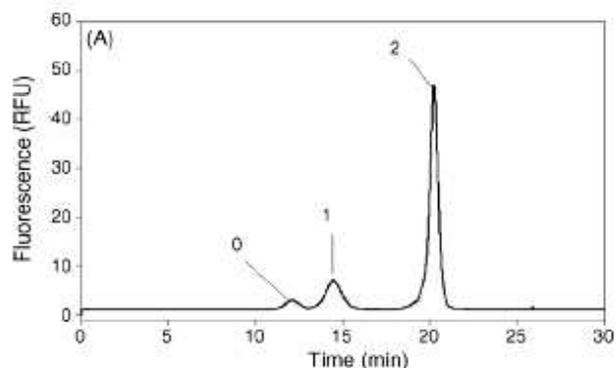


Figura 2.5. Cromatograma de HPLC-GP de dIPPR. 0) Baculovirus, 1) dIPPR, 2) EGFP. (Tomada de Mena et al., 2005).

La implementación de esta metodología para la diferenciación y cuantificación de tIPPR, encierra el reto adicional de separarla del principal intermediario, que en este caso es la dIPPR, ya que la diferencia de tamaños entre estas estructuras es de 5 nm. Una de las alternativas para lograr diferenciar estas estructuras es considerar las diferencias de estabilidad de las mismas ante calcio. La dIPPR es estable en un ambiente sin calcio y se ha observado que una concentración de calcio por arriba de 10 mM (Ready et al., 1988; Estes y Cohen, 1989; Mena, 2007) desestabiliza la partícula desensamblándola en cores y VP6. En lo que respecta a la tIPPR, esta es estable en una solución con calcio (por arriba de 10-20 nM para SA11 y en otras cepas como OSU hasta 600 nM) (Dormitzer et al., 2000; Ruiz et al., 1996) por lo que se convierte en una alternativa para diferenciar entre la dIPPR y tIPPR.

Se han propuesto otras metodologías y procedimientos para cuantificar las tIPPR, basados principalmente en inmunoensayos. Estos pueden detectar la presencia de un epítipo específico presente en la cápside, algunos de ellos conformacionales. Sin embargo, no diferencian entre proteína no ensamblada, PPV e intermediarios, lo que los hace inexactos y poco confiables para nuestros propósitos. En esta línea, Vieira y colaboradores (2005) propusieron una metodología para llevar a cabo la cuantificación de tIPPR en la que se utiliza un anticuerpo anti-VP7 el cual es específico para un epítipo conformacional de la proteína VP7 cuando ésta se encuentra presente en la cápside, obteniéndose valores de tIPPR de 60 µg/mL. Por otra parte, Mena (2007) optimizó la producción de dIPPR obteniendo valores de dIPPR de 3.12 µg/mL. Con las concentraciones obtenidas por Mena (2007) y considerando una producción igual de eficiente hacia la formación de tIPPR, el valor no ascendería a más de 5 µg/mL, el cual comparado al valor obtenido por Vieira y colaboradores (2005) está 12 veces por debajo. Esto puede deberse probablemente a que su anticuerpo no solamente reconoce epítopes contra VP7 ensamblado en PPR sino también monómeros o trímeros de VP7 presentes en el caldo de cultivo. Jiang y colaboradores (1998) por su parte, cuantificaron tIPPR de muestras concentradas por colchón de sacarosa mediante SDS-PAGE. Como en el caso anterior, se estaría sobrevalorando la concentración máxima de tIPPR ya que las muestras analizadas podrían contener una gran cantidad de proteínas virales sin ensamblar, ya que

no es un proceso de purificación adecuado con el cual determinar la concentración exacta de las cápsides.

2.6.1. ELECTROFORESIS CAPILAR

En este trabajo proponemos a la electroforesis capilar (EC) como una posible solución al problema de diferenciación de la dIPPR y la tIPPR. Esta metodología permite separar moléculas mediante las diferencias en su migración bajo la influencia de un campo eléctrico (relación carga/masa, punto isoeléctrico, entre otras). En la EC se pueden realizar separaciones de diversas estructuras (proteínas, compuestos orgánicos e inorgánicos y virus) mediante la aplicación de altos voltajes en capilares de μm (20-500) de diámetro (que permiten una mejor disipación de calor), que permite, con base en diferencias en las movibilidades de las partículas, separar desde ADN, ARN, compuestos quirales, péptidos, proteínas, virus, entre otros compuestos (Camilleri, 1998; Kremser et al., 2004; Goodridge et al., 2004). En los últimos años se ha utilizado esta metodología para diferenciar cápsides virales (Ver tabla 2.3.). Se han implementado tanto la electroforesis capilar zonal (ECZ) (separación mediante las diferencias en la relación carga/masa de los compuestos), como el isoelectroenfoque (ECI) (separación mediante diferencia en puntos isoeléctricos) (Kremser et al., 2007). Schnabel y colaboradores (1996), implementaron la ECI para determinar el punto isoeléctrico (pI) del rinovirus humano (HRV) y Goodridge y colaboradores (2004) determinaron el punto isoeléctrico de PPV de Norovirus, con lo que se demostró la viabilidad del sistema al analizar macroestructuras como las cápsides virales y pseudos partículas virales.

La ECZ ha permitido realizar análisis de sueros de plasma de pacientes que padecen alguna enfermedad y determinar la presencia de diferentes analitos de interés, así como la separación de microorganismos en una muestra, la caracterización de virus, estudios de unión a ligandos, etc. (Meera y Armstrong, 2003; Breadmore et al., 2004; Kremser et al., 2004). Esta metodología se ha implementado para el análisis de diversos virus entre los que se encuentran los rinovirus, el virus del mosaico del tabaco, interacciones del virus del herpes simple con enzimas, hepatitis C, entre otros (Hjerten et al., 1987; Okun et al., 1999; Attallah et al., 2004; Iqbal et al., 2007).

Tabla. 2.3. Algunos virus analizados por EC.

Virus	Movilidad ($10^{-9} \text{m}^2 \text{V}^{-1} \text{s}^{-1}$)	Solución electrolítica de separación (BGE)
Mosaico del tabaco	52-55	2 mM Borato pH 8.35
Adenovirus recombinante tipo 5	18	25 mM Fosfato pH 7
HRV14	9.6	0.1 M Borato pH 8.3, 10mM SDS
HRV16	20.6	0.1 M Borato pH 8.3, 10mM SDS
HRV2	22.7	0.1 M Borato pH 8.3, 10mM SDS
HRV49	11	0.1 M Borato pH 8.3, 10mM SDS
HRV2	10.9	0.1 M Borato pH 8.3, 0.5% DOC, 0.05% SDS, 0.5% Triton X-100
HRV14	7	0.1 M Borato pH 8.3, 10 mM D-PEG
HRV2	8.5	0.1 M Borato pH 8.3, 10 mM D-PEG

(Adaptada de Kremser et al., 2007)

Uno de los problemas principales a los que se enfrentan al analizar muestras virales, es la identificación de los picos correspondientes a las cápsides virales, ya que el principal método de purificación es por gradiente de CsCl que como se mencionó en la sección 2.3., presentan una gran cantidad de proteínas sin ensamblar. Para solventar este problema se han analizado las muestras bajo diferentes condiciones que permiten diferenciar las cápsides virales, como lo son el desensamblaje y la degradación del material genético del virus (Okun et al., 1999). Esto podría solucionarse si se analizan muestras con una pureza mayor. En esta metodología existen diversos puntos importantes a considerar además del problema de la identificación de los picos que corresponde a la cápside viral, ya que puede existir interacción de la pared del capilar con las estructuras virales. Para resolver este problema se recomienda utilizar soluciones con concentraciones mayores de 30 mM (fosfatos, borato, tris, etc.), además adicionar aditivos al buffer como SDS, PEG, deoxicolato, tritón X-100 entre otros, en concentraciones que no desestabilicen las cápsides virales (Okun et al., 1999; Kremser et al., 2005). La EC es una metodología compleja, pero trae consigo las grandes ventajas como sus tiempos cortos de análisis (algunos minutos), volumen pequeño de muestra y que es un procedimiento analítico de alta sensibilidad que podría permitir diferenciar y cuantificar las PPR.

Capítulo 3

Justificación y objetivos

3.1. JUSTIFICACIÓN

La diferenciación de dIPPR y tIPPR es necesaria, ya que en la producción de tIPPR se producen además dIPPR, que sirven de templado para la formación de la tIPPR. Diferenciarlas y cuantificarlas nos permitirá conocer la concentración de ambas en los cultivos infectados, lo que nos ayudará a determinar los parámetros cinéticos en su producción que nos permitan analizar las producciones de ambas PPR.

3.2. OBJETIVO GENERAL

Desarrollar una metodología que permita diferenciar y cuantificar partículas pseudo rotavirales de triple y doble capa y, determinar los parámetros cinéticos característicos de ambas producciones.

3.3. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Desarrollar un método eficaz de diferenciación y cuantificación de tIPPR.
2. Caracterizar las tIPPR obtenidas a partir de la coexpresión simultánea de las tres proteínas virales y evaluar cinéticas de producción de tIPPR y dIPPR.
3. Determinar los parámetros cinéticos de producción de tIPPR y dIPPR a una multiplicidad de infección de 1 ufp/cel para cada baculovirus (velocidades de producción (q_p) de las cápsides virales, así como la productividad y rendimientos de ensamblaje de proteínas).

Capítulo 4

Materiales y métodos

4.1. LÍNEAS CELULARES Y TÉCNICAS DE CULTIVO

Se trabajó con las líneas celulares de los insectos, *Trichoplusia ni* (High Five[®]) y *Spodoptera frugiperda* (Sf9). Se utilizó un medio libre de suero SF900-II (Invitrogen). Las células se cultivaron en matraces agitados de 250 mL (volumen de trabajo de 60 mL) para la amplificación de baculovirus y las cinéticas de producción de PPR. Los cultivos se mantuvieron con agitación constante a 115 RPM y 27 °C. La concentración y tamaño celular se determinaron utilizando un contador de partículas Coulter Multisizer II (Coulter Electronics) con un tubo de apertura de 100 µm. La viabilidad celular se determinó utilizando azul de tripano al 0.5% en PBS pH 7.4 en hematocitómetro.

4.2. BACULOVIRUS RECOMBINANTES

Se utilizaron baculovirus recombinantes de *Autographa californica* NPV en los que se insertó el gen de interés bajo el promotor de poliedrina (*polh*). El baculovirus que codifica para la proteína de fusión EGFPVP2 (Charpilienne et al., 2001, bacEGFPVP2) fue proporcionado por el Dr. Jean Cohen (INRA-CRJ; Francia) y los baculovirus que codifican para las proteínas VP6 (bacVP6) y VP7 (bacVP7) fueron proporcionados por la Dra. Susana López (IBT-UNAM). Los baculovirus codifican para las proteínas de las cepas de rotavirus RF (EGFPVP2) y SA11 (VP6 y VP7).

La amplificación de los stocks virales se realizó en matraces agitados de 250 mL (volumen de trabajo 60 mL) infectando células a una concentración de 0.5×10^6 cel/mL con los baculovirus a una MDI de 0.01 ufp/cel y cosechando el cultivo a las 96 horas. El cultivo se centrifugó a 9,000 x g y se adicionó 0.5% de suero fetal bovino (SFB) al sobrenadante. El título viral se determinó como se describe en la sección 4.3.

4.3. DETERMINACIÓN DEL TÍTULO VIRAL

El título viral se cuantificó con la metodología implementada por Mena y colaboradores (2003), la cual se basa en la determinación de la viabilidad celular después de agregar diluciones seriadas de virus a través de la reacción del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro de tetrazolio) con la dehidrogenasa mitocondrial de células viables. Esta reacción produce una sal insoluble de formazan color azul que se cuantifica espectrofotométricamente. Se realiza una gráfica de dilución contra absorbancia a 570 nm. Esto resulta en una curva tipo sigmoideal (Ver sección 4.12.1.), cuyo ajuste nos proporciona la dilución a la cual el 50% de las células fueron infectadas (TCLD₅₀), con lo que se puede calcular el título viral como se describe en la sección 4.12.1. (O'Reilly et al., 1994; LaBarre y Lowy, 2001). Se utilizaron placas de 96 pozos en las cuales se colocaron 5×10^3 células por pozo en 50 μ L de medio SF900-II. Posteriormente se prepararon diluciones del virus desde 10^{-1} hasta 10^{-10} con las que se infectaron los pozos. 6 días después de la infección se añadieron 10 μ L de una solución de MTT (5 g/L) a cada pozo y se agitó la placa durante 2 horas. Pasadas las 2 horas se centrifugaron las placas a 4,000 x g 10 minutos y se extrajo el sobrenadante. Las sales insolubles de formazan se disolvieron en 50 μ L de dimetilsulfoxido (DMSO) y se midió absorbancia a 570 nm en un lector de microplacas. Con base en la TCLD₅₀ y con las ecuaciones que se describen en la sección 4.12.1. se determina el título viral.

4.4. IDENTIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS VIRALES

Las proteínas virales de muestras de cultivos y purificadas se analizaron mediante geles de poliacrilamida al 10 o 12% y su tinción por azul de Coomassie o plata. Se realizaron Western blot de las muestras de cultivo transfiriendo las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Millipore, cat. HAHY304F0), las cuales se incubaron con los anticuerpos anti-rotavirus cepa YM, anti-TLP (proporcionado por la Dra. Susana López) y cabra anti-todos los serotipos de rotavirus (Abd serotec) a una dilución de 1:1000, 1:1500 y 1:500, respectivamente. Los anticuerpos secundarios están acoplados a peroxidasa y se utilizaron a una dilución de 1:2000 (todas las diluciones se realizaron en el buffer TBS:

0.1% Tween-20). Se revelaron los Western blot mediante la reacción química entre la peroxidasa y carbazol. Los geles teñidos por Comassie y plata fueron analizados por densitometría con el software NIH Image.

4.5. PRODUCCIÓN DE PPR

Para la producción de las PPR se realizaron coinfecciones con los baculovirus bacEGFPVP2, bacVP6 y bacVP7. Se utilizó una MDI de 5 ufp/cel para cada baculovirus durante los primeros experimentos, y posteriormente se utilizó a una MDI de 1 ufp/cel para cada uno de los baculovirus (el cambio en la MDI se debió a que se encontraron mejores condiciones para la producción de dlPPR por Mena (2007)). Las infecciones se realizaron a una densidad celular de 0.5×10^6 cel/mL y una viabilidad celular por arriba del 90%, ya sea para dlPPR o tlPPR. Para seguir las cinéticas de producción de PPR se tomaron muestras de 1 mL cada 24 horas desde el tiempo 0 hasta que la viabilidad celular decayó por debajo del 30%. Las muestras se centrifugaron a 9,000 x g para separar el sobrenadante y el pellet celular. El sobrenadante se almacenó a 4°C para su posterior purificación. El pellet celular se resuspendió en 300µL de una solución TNC (10 mM Tris pH 7.4, 140 mM NaCl, 10 mM CaCl₂), en el caso de la producción de tlPPR, o, para la recuperación de dlPPR en buffer 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA. La lisis del pellet celular se realizó mediante 3 etapas de congelado-descongelado y su posterior centrifugación a 9,000 x g para separar el sobrenadante.

4.6. PURIFICACIÓN DE LOS ESTÁNDARES DE PPR

La obtención de estándares es importante para caracterizar la dlPPR y tlPPR. La dlPPR y tlPPR se caracterizó por HPLC, SDS-PAGE, Western blot y electroforesis capilar. Los primeros estándares obtenidos se purificaron por gradientes de CsCl, y estas muestras fueron utilizadas en algunos de los experimentos. Posteriormente, se implementó una metodología de purificación de tlPPR utilizando una columna empacada con una resina de exclusión molecular (HW65F, Tosoh) y un equipo de FPLC (AKTA *Prime*, Amersham Pharmacia Biotech), con la finalidad de obtener una muestra más pura.

4.6.1. PURIFICACION DE tPPR

4.6.1.1. GRADIENTES CsCl

La primera etapa de la purificación de los estándares se llevó a cabo mediante la concentración inicial de las muestras por un colchón de sacarosa al 35% a 82,000 x g durante 2 horas a 4 °C con un rotor SW28 en la ultracentrífuga Optima L-90K (Beckman Coulter). El concentrado se resuspendió en una solución buffer TNC y se adicionó al tubo 1.89 g de CsCl para formar el gradiente en 4.5 mL de muestra. El tubo se centrifugó a 116,000 x g durante 18 horas a 4 °C con un rotor SW55. Las bandas generadas en el gradiente de CsCl se colectaron y se analizaron por medio de geles desnaturalizantes de poliacrilamida y Western blot para asegurarnos de la presencia de las proteínas virales, y por HPLC para determinar la pureza de las muestras.

4.6.1.2. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Esta metodología fue implementada por Peixoto y colaboradores (2006). Consiste principalmente en la concentración de las muestras del cultivo para finalmente realizar una cromatografía de permeación en gel y una ultracentrifugación. Se adecuó la metodología a los equipos existentes en el laboratorio.

La muestra proveniente de cultivo se centrifugó a 9,000 x g durante 10 minutos y el pellet se resuspendió en 1 mL de buffer TNC y se sometió a tres etapas de congelado/descongelado para lisar las células. Se centrifugó a 9,000 x g durante 10 minutos. Los sobrenadantes obtenidos se concentraron en el equipo de ultrafiltración AMICON (Millipore, USA) utilizando una membrana de celulosa de 30kDa (Millipore, USA). Cada uno de los buffer utilizados en la separación fueron filtrados por membrana de 0.2µm y desgasificados (las muestras solamente fueron filtradas por membrana de 0.2µm). El concentrado se inyectó en el equipo de FPLC (AKTA *Prime*, Amersham Pharmacia Biotech) con una columna empacada con la resina HW65F (Tosoh, USA). La inyección de muestra al equipo FPLC (Akta Prime) no debe ser superior al 10% del

volumen de columna (volumen de columna, 384 mL), por lo que se decidió inyectar solamente 25 mL para cada stock de purificación que provenía de sobrenadante de cultivo. Esta resina tiene un tamaño de poro de 100 nm. Se mantuvo un flujo de 2 mL/min durante toda la purificación utilizando una solución amortiguadora TNC. Las PPR eluyeron alrededor de los 170 mL después de haber realizado la inyección al equipo. Las PPR purificadas fueron recolectadas para posteriormente concentrarlas. Se utilizaron dos metodologías para concentrar las muestras, una fue por ultracentrifugación a 125,000 x g durante 90 minutos con un rotor 45 Ti en la ultracentrífuga Optima L-90K (Beckman Coulter, USA). El pellet obtenido de la ultracentrifugación se resuspendió en 500µL de buffer TNC. La otra alternativa que se consideró para evitar la etapa de ultracentrifugación fue concentrar el purificado por medio del equipo de ultrafiltración AMICON (Millipore, USA) con una membrana de 30kDa (Millipore, USA).

4.6.2. PURIFICACIÓN DE dIPPR

La purificación de dIPPR ya había sido montada en el laboratorio. Esta consiste en obtener un cultivo infectado con los baculovirus bacEGFPVP2 y bacVP6 a una MOI de 1 ufp/cel de cada baculovirus y su cosecha a las 96 horas. El cultivo se centrifugó a 9,000 x g durante 10 minutos. El pellet celular se lisó durante 3 etapas de congelado-descongelado y se resuspendió en un volumen adecuado de buffer. La primera etapa de la purificación fue la separación por dos fases acuosas (Benavides, et al., 2006). La fase recuperada rica en PEG se diafiltró en 10 mM tris pH 8, 1 mM EDTA utilizando un cartucho de fibras huecas en el equipo de ultrafiltración MINIM SYSTEM (PALL, USA). Las dIPPR diafiltradas (25 mL) se inyectaron en el equipo FPLC (AKTA *Prime*, Amersham Pharmacia Biotech) con una columna empacada con la resina HW65F (Tosoh), se mantuvo un flujo constante de 3 ml/min utilizando un buffer 10 mM Tris pH 8, 1 mM EDTA. La dIPPR eluyó aproximadamente a los 170 mL después de la inyección. La concentración final de las dIPPR purificadas se realizó mediante ultrafiltración en el equipo AMICON (Millipore) utilizando membranas de 30 kDa (Millipore).

4.7. CARACTERIZACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE EGFPVP2 POR HPLC Y ESPECTROFLUORÍMETRO

La proteína EGFPVP2 se cuantificó a través de un espectrofluorímetro (Perkin Elmer LS55) a las longitudes máximas de absorción (484 nm) y emisión (510 nm) para la EGFP, analizando la intensidad de fluorescencia, y en el HPLC utilizando un detector de fluorescencia marca Waters (2475), analizando el área bajo la curva de fluorescencia. En cada uno de los equipos se realizó una curva estándar de EGFP con un stock comercial (Clontech). Se determinó la concentración de proteína total en las muestras mediante el análisis por Bradford (Bio-rad).

Se implementó la cromatografía líquida de alta presión utilizando el equipo HPLC Delta Prep 4000 marca WatersTM (Massachusetts, USA) con los siguientes componentes:

- Controlador Prep LC Waters
- Detector de fluorescencia Waters 2475 (λ_{ex} 484 nm y λ_{em} 510 nm)
- Detector de absorbancia Waters 2484 (λ 260 y 280 nm)
- Software Empower

Se utilizó un flujo de 0.9 mL/min a 37°C con un buffer TNC sin la adición de calcio. Además, se utilizaron las columnas de permeación en gel Ultrahydrogel 500 y Ultrahydrogel 2000 (7.8 mm diámetro interno y 30 cm de largo) (Waters, USA). Estas columnas tienen un tamaño de poro de 50 nm y 200 nm respectivamente. Las muestras provenientes de sobrenadante de infecciones se filtraron con membranas de 0.2 μ m (PALL) y las muestras de pellet (150 μ L) se trataron con 20 μ L de DNAsa (1000 U/mL) y 10 μ L RNasa (5000 U/mL) durante 4 horas a 37°C. Después de la digestión, el pellet se centrifugó a 9,000 x g durante 10 minutos y el sobrenadante se filtró con membrana de 0.2 μ m (PALL). Al equipo cromatográfico se inyectaron 100 μ L de las muestras por analizar. El pellet resultante de la lisis celular se analizó en el espectrofluorímetro para determinar la concentración de EGFPVP2 retenida por la célula. El pellet se resuspendió en buffer para que la concentración final fuera de 0.5x10⁶ cel/mL y el volumen de

muestra analizado fue de 200 μ L. Se utilizó una apertura del monocromador de la lámpara de 2.5 nm y la apertura del fotomultiplicador de 20 nm.

Se conoce que por cada mol de EGFP se tiene un mol de EGFPVP2 (Charpilienne et al., 2001), además se conoce la relación estequiométrica de EGFP en la cápside con la que se calculó el factor másico para determinar la concentración de dIPPR y tIPPR. Los factores másicos son 4.4, 14.4 y 24.42 para las partículas pseudo rotavirales de una capa (sIPPR), dIPPR y tIPPR respectivamente.

Para la curva de calibración de EGFP en HPLC se utilizó un detector de fluorescencia a λ_{ex} de 484 nm y λ_{em} 510 nm. En el análisis por HPLC se inyectaron los pellets y sobrenadante de cultivos infectados, mientras que para el cálculo de la EGFP que no se liberó en el lisado celular (retenido) se utilizó el espectrofluorímetro. En la Figura 4.1. y 4.2. se observan las curvas de calibración de EGFP tanto en HPLC como en espectrofluorímetro que se utilizaron para la cuantificación de PPR.

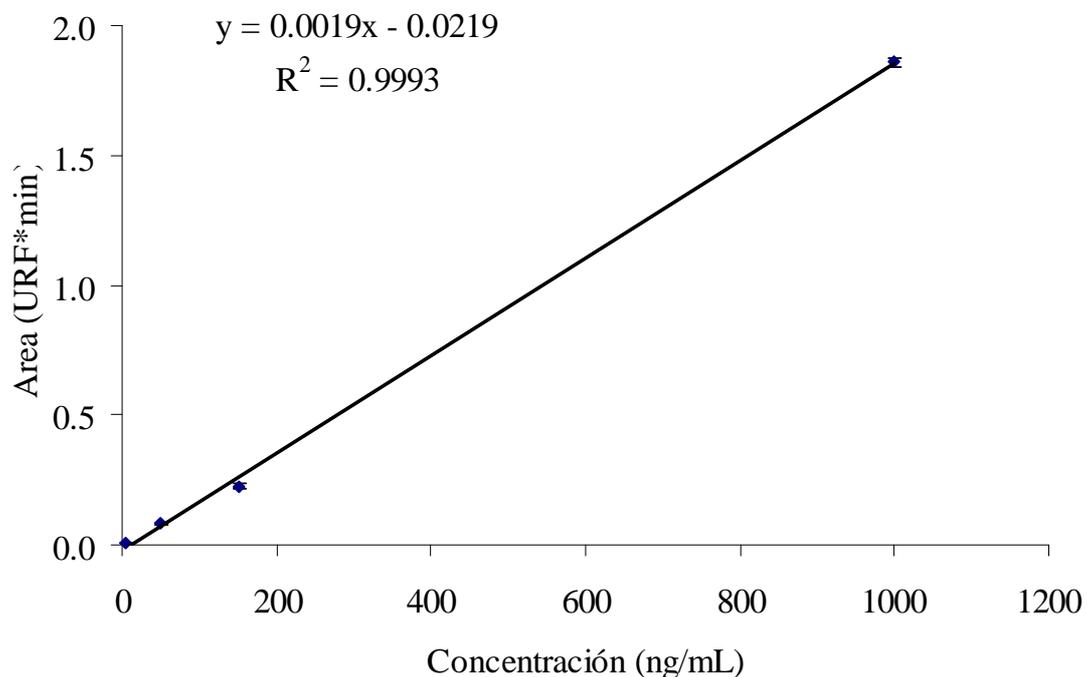


Figura 4.1. Curva estándar de EGFP en HPLC. Se graficaron las unidades relativas de fluorescencia (URF) por minuto (área) contra la concentración en ng/mL de EGFP. Para facilitar su representación, las áreas (URF*min) se dividieron por 1×10^8 .

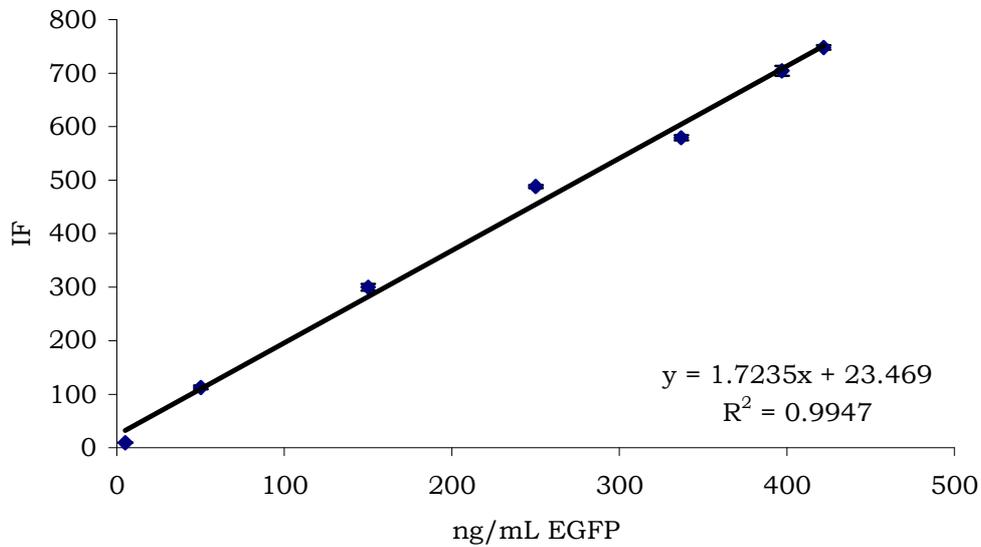


Figura 4.2. Curva estándar de EGFP en espectrofluorímetro. Se graficó la intensidad de fluorescencia (IF) contra la concentración en ng/mL de EGFP.

De estas curvas de calibración se obtuvieron las ecuaciones correspondientes para obtener la concentración de muestras problema (Ecuación 4.7.1. y 4.7.2.), con las que se determinó la concentración de EGFPVP2 y de PPR en el cultivo utilizando los factores másicos señalados anteriormente.

HPLC

$$\text{ng EGFP/mL} = (\text{Area}(\text{URF} \cdot \text{min}) + 2 \times 10^6) / 187503 \quad \text{Ecuación 4.7.1.}$$

Espectrofluorímetro

$$\text{ng EGFP/mL} = (\text{IF} - 23.47) / 1.725 \quad \text{Ecuación 4.7.2.}$$

4.8. MICROSCOPIA ELECTRÓNICA

Las muestras de tPPR se colocaron en rejillas (200 mesh FCF200-Cu) cubiertas con Formvar/carbono (Electron Microscopy Sciences, EUA). Se depositaron 10 μL de muestra sobre la rejilla y se dejó reposar durante 3 minutos, posteriormente se secó con un papel filtro y se adicionó una solución de acetato de uranilo al 2% durante 2 o 3

minutos y se lavó la rejilla con agua MQ, se secó y se almacenó. Las muestras se prepararon 24 horas antes del análisis al microscopio. La observación se realizó en el microscopio electrónico de transmisión Zeiss EM 900 (Zeiss, Alemania) a magnificaciones desde 3,500 hasta 250,000 X.

4.9. DESENSAMBLAJE DE dlPPR Y tlPPR

Las muestras purificadas de tlPPR se pueden desensamblar y producir dlPPR al tratarlas con una solución de EDTA, quelando el calcio presente en la solución. Para lograr esto, las muestras se trataron con una solución de EDTA 0.5 M, pH de 8, la que se utilizó para llevar las muestras a una concentración final de 10 mM EDTA. La muestra se incubó durante 1 hora a 37 °C (Patton et al., 2000) en un equipo Termostat (Eppendorf, USA). La muestra se analizó por HPLC antes y después del experimento. Por otra parte, las dlPPR se desensamblan cuando la concentración de calcio en el buffer es mayor a 10mM (Mena, 2007). Este desensamblaje se llevó a cabo a 37°C durante 4 horas incubando en el equipo Termostat (Eppendorf, USA). La muestra de dlPPR desensamblada también se analizó en el HPLC.

4.10. ELECTROFORÉISIS CAPILAR

Se utilizó el equipo P/ACE MDQ Capillary Electrophoresis System (Beckman, Coulter) con un detector de arreglo de diodos (PDA). Este equipo permite realizar corridas desde 1,000 hasta 30,000 volts. La temperatura del capilar y del reservorio de muestras se mantuvo constante a 20°C mediante un sistema de enfriamiento líquido Fluorinert™ FC-77 (3M, Bélgica).

4.10.1. ELECTROFORÉISIS CAPILAR POR ISOELECTROENFOQUE

Para trabajar con la técnica de isoelectroenfoco se utilizó el kit *ProteomaLab* cIEF 3-10 (Beckman Coulter). Se utilizó un capilar neutro recubierto con poliacrilamida de 50µm de diámetro interno. El kit cuenta con las soluciones de un anfólito pH 3-10, gel, ácido

fosfórico 1M, hidróxido de sodio 1M y los estándares de proteínas (ribonucleasa A, anhidrasa carbónica, β -lactoglobulina y péptido CCK). La muestra se preparó utilizando una mezcla de gel (100 μ L), anfolito (4 μ L) y entre 5 y 10 μ L de la muestra de tIPPR purificada como se describe en la sección 4.6.1.2. (el volumen de muestra no debe sobrepasar el 10% del volumen final) y se inyectó por presión al capilar durante 1.5 minutos a 30 psig. Se realizó la separación de proteínas mediante la aplicación de 15kV durante 6 minutos (esto para lograr la separación de las proteínas mediante sus puntos isoeléctricos dentro del capilar, enfoque). Posteriormente, se aplicó presión (5 psig) y voltaje (21 kV) para lograr que las proteínas migren hacia el detector. La detección de las proteínas se realizó a 280 nm. Se realizó una curva estándar de punto isoeléctrico (pI) contra tiempo de migración utilizando los estándares proteicos descritos anteriormente. Se inyectaron muestras de tIPPR a diferentes concentraciones para determinar su punto isoeléctrico mediante la curva de calibración generada.

4.10.2. ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL

En esta metodología se utilizaron un capilar de sílica fundida y uno neutro (recubierto de polivinilalcohol) de 75 μ m de diámetro interno. Las corridas se realizaron desde 10 hasta 30 kV utilizando una solución de 10 mM de fosfatos con o sin la adición de surfactantes (10 mM SDS y 10 mM deoxicolato de sodio en el buffer de separación), esto con la finalidad de evitar la interacción entre las macroestructuras (cápsides virales) y la superficie del capilar que pudiera resultar en la retención de las cápsides por el capilar y en la pérdida de resolución al separar dIPPR y tIPPR. Con base en los resultados se pueden calcular las diferentes movilidades electroforéticas de las partículas, además de la resolución y número de platos teóricos. Cuando se utilizó un capilar de sílica fundida se observó un efecto en la movilidad ocasionado por la interacción de los silanoles cargados con el electrolito base, que ocasiona un flujo que contribuye en la movilidad final de los analitos (flujo electrosmótico, FEO). Para determinar el valor del FEO y conocer la movilidad de los analitos, es necesario incorporar un marcador. El FEO puede ser observado incorporando en las separaciones analitos sin carga como es el óxido de mesitilo, el cual mantiene su carga neta en cero a diversos valores de pH. En ocasiones

debe incorporarse una concentración conocida de estándar interno (algún compuesto que migre diferente y no influya en la separación) para lograr minimizar los efectos que puedan ocasionar deficiencias en la inyección que repercutan en las áreas bajo la curva. La detección se realizó mediante un detector de arreglo de diodos a las longitudes de onda de 205, 260 y 280 nm. La longitud del capilar utilizado fue de 101.7 cm de longitud total y de 91.2 cm de longitud efectiva del capilar. Se mantuvo la temperatura constante a 20 °C para todas las separaciones.

4.11. EVALUACIÓN DE METODOLOGÍAS

La validación de la cuantificación de la tPPR por electroforesis capilar zonal se realizó utilizando el protocolo desarrollado por la INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION OF TECHNICAL REQUIREMENTS FOR REGISTRATION OF PHARMACEUTICALS FOR HUMAN USE: Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1).

4.11.1. ESPECIFICIDAD

Se determinó la presencia e identidad de las PPR en las muestras analizadas por medio de SDS-PAGE, Western blot, microscopía electrónica y HPLC.

4.11.2. GENERACIÓN DE CURVA ESTÁNDAR Y LINEARIDAD DEL SISTEMA

Se realizó una curva estándar para cada tipo de muestra utilizando el intervalo de concentraciones de tPPR y dPPR. Para determinar la linealidad del sistema se hicieron 5 diluciones de estándar con el buffer de almacenaje de cada muestra y se evaluará la linealidad del método. Para que el método sea lineal, la pendiente de la recta generada entre el valor conocido y el determinado debe ser cercana a uno y los coeficientes de regresión r y r^2 deben ser cercanos o mayores a 0.98.

4.11.3. PARALELISMO

Se analizaron muestras de cultivo infectado para verificar los resultados. Además, se analizaron muestras purificadas de pellet de cultivo infectado y muestras de cultivo a diferentes tiempos de infección.

4.11.4. PRECISIÓN Y EXACTITUD

Se realizaron por lo menos 3 mediciones de estándares a 3 concentraciones distintas. Se determinó en cada caso la concentración experimental promedio, la desviación estándar, el coeficiente de variación, y el intervalo de confianza. Estos valores dictaron si el método es preciso. Sólo se consideró el método preciso si el intervalo de confianza es menor al 5% de la concentración experimental promedio para cada caso. La exactitud se determinó haciendo la prueba de t de Student de las mediciones anteriores. Además, se realizaron mezclas de diferentes concentraciones del estándar con distintos volúmenes de la muestra representativa. Se determinó la concentración de ADN en cada una de las mezclas, y se comparará con aquella esperada. El valor experimental debe estar entre el 97 y 103 % del esperado.

4.11.5. REPRODUCIBILIDAD

La concentración de tIPPR y dIPPR en las muestras se analizó en diferentes días. Se determinó la F experimental y se comparó con tablas para determinar la reproducibilidad. Se consideró que el método es reproducible si la certeza es mayor al 98 %.

4.11.6. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Se determinó a través de mediciones con el estándar en buffer relevante hasta las concentraciones más bajas posibles donde haya detección (señal de absorbancia mayor al ruido del equipo) y donde la curva estándar sea lineal. Se compararán los resultados con las siguientes fórmulas:

Límite de detección $LD = \frac{3.3\sigma}{S}$

Límite de cuantificación $LC = \frac{10\sigma}{S}$

Dónde s = desviación estándar de la respuesta obtenida de la determinación de la exactitud y S es igual a la pendiente de la curva de calibración.

4.12. CONSIDERACIONES MATEMÁTICAS

4.12.1. CÁLCULO DEL TÍTULO VIRAL

Mediante el análisis de la curva de absorbancia contra dilución del stock viral es posible determinar la dilución viral a la cual el 50% de las células han sido infectadas (TCLD₅₀). La curva sigue un comportamiento sigmoideal y su ajuste (Ecuación 4.12.1.) nos proporciona el valor de TCLD₅₀ (Ecuación 4.12.2.).

$$Y = Y_0 + \frac{a}{1 + \left(\frac{D}{D_0}\right)^b} \quad \text{(Ecuación 4.12.1.)}$$

Donde Y es la absorbancia, Y₀ es la mínima absorbancia detectada (la mínima concentración de células detectadas), a es la absorbancia máxima detectada, D es la dilución, D₀ es la dilución a la cual el 50% de la respuesta de absorbancia (1/TCLD₅₀) y b es la pendiente del factor. Ya determinada la dilución a la que el 50% de células ha sido infectadas se determinó el TCLD₅₀ (Ecuación 4.12.2.).

$$\text{TCLD}_{50}/\text{mL} = \frac{1}{D_0 V} \quad \text{(Ecuación 4.12.2.)}$$

Donde V es el volumen de la dilución del stock viral.

El título viral se calculó mediante las ecuaciones 4.12.3 y 4.12.4 (O'Reilly et al., 1994).

$$\log\text{TCID}_{50}/\text{mL} = 0.912 (\log\text{TCLD}_{50}/\text{mL}) + 1.674 \quad (\text{Ecuación 4.12.3.})$$

$$\text{pfu}/\text{mL} = \text{TCID}_{50}/\text{mL} \times 0.69 \quad (\text{Ecuación 4.12.4.})$$

En el desarrollo de esta metodología para calcular el título viral, Mena y colaboradores (2003) realizaron la comparación con otros métodos y no se observaron diferencias significativas. Con fines prácticos y comparativos se utilizará la nomenclatura de ufp/ml para el título viral.

4.12.2. CÁLCULO DE LA VELOCIDAD ESPECÍFICA DE PRODUCCIÓN DE PROTEÍNA

El cálculo de la velocidad específica de producción de proteína se realizó según el modelo cinético de Luedeking-Piret (Ecuación 4.12.5.). En este modelo se contempla que la cinética de producción puede estar asociada, no asociada a crecimiento o ambos:

$$dP/dt = (\alpha * \mu + \beta)X \quad (\text{Ecuación 4.12.5.})$$

Donde α es el rendimiento de producto por biomasa ($\text{g}/10^6\text{cel}$) y β la velocidad específica de producción de producto ($\text{g}/10^6\text{cel} * \text{h}$), μ la velocidad específica de crecimiento y X la concentración celular.

Ya que las células infectadas dejan de crecer, y sólo estas son las células que producen proteína heteróloga, la producción de proteína heteróloga no está asociada a crecimiento (Ecuación 4.12.6.) y la ecuación 4.12.5. toma la forma:

$$dP/dt = \beta X \quad (\text{Ecuación 4.12.6})$$

Integrando la ecuación 4.12.6. y considerando que P_t a $t=0$ es 0, la ecuación queda como se muestra (Ecuación 4.12.7.):

$$\beta = P_t / \int_0^t X_v dt \quad (\text{Ecuación 4.12.7.})$$

Donde X_v es la concentración de células viables.

4.12.3. CÁLCULO DE LA MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA, EFICIENCIA Y VOLUMÉN DE INYECCIÓN

La movilidad electroforética, al igual que el coeficiente de partición en HPLC, es un parámetro constante bajo ciertas condiciones de operación y separación, que permite caracterizar la separación de analitos. Ésta se calculó mediante la siguiente expresión (Ecuación 4.12.8.):

$$\mu_{ef} = \mu_{app} - \mu_{FEO} \quad (\text{Ecuacion 4.12.8.})$$

En donde μ_{ef} es la movilidad total, μ_{app} es la movilidad de la muestra en el capilar y μ_{FEO} es la movilidad que aporta el FEO. La μ_{FEO} se calcula introduciendo un marcador al sistema u observando un pico negativo de absorbancia en la corrida electroforética (ese punto negativo de absorbancia es característico del FEO). La μ_{app} se calcula mediante la siguiente expresión (Ecuación 4.12.9.):

$$\mu_{app} = v/E = L_d * L_t / Vt \quad (\text{Ecuación 4.12.9.})$$

Donde v es la velocidad de migración del analito y E el campo eléctrico aplicado. L_d es la longitud del capilar al detector y L_t es la longitud total del capilar. V , es el promedio de voltaje aplicado durante la corrida y t , el tiempo.

La eficiencia de las separaciones en electroforesis capilar se determina por medio del número de platos teóricos, el cual puede ser calculado mediante la siguiente expresión (Ecuación 4.12.10.) (Foley y Dorsey, 1983):

$$N = [41.7 * (t_m / W_{0.1}) / [(a_{0.1} / b_{0.1}) + 1.25]] \quad (\text{Ecuación 4.12.10})$$

Donde N es el número de platos teóricos, t_m el tiempo de migración del analito de interés, $W_{0.1}$ es el ancho de pico al 10% de la altura del pico, $a_{0.1}$ es el ancho de la primera mitad del pico al 10% de la altura del pico y $b_{0.1}$ es el ancho de la segunda mitad del pico al 10% de la altura del pico.

El volumen de inyección se calcula como se describe en la siguiente ecuación 4.12.11.(Olechno y Nolan, 1996):

$$V_{iny} = \Delta P \pi d^4 t / 128 \eta L \quad (\text{Ecuación 4.12.11.})$$

Donde ΔP es la presión aplicada al sistema, d el diámetro del capilar, t el tiempo de inyección, η la viscosidad del fluido y L la longitud del capilar.

Capítulo 5

Resultados

5.1. PRODUCCIÓN DEL ESTÁNDAR DE tPPR

Para la producción y purificación de tPPR por gradiente de CsCl y FPLC, se realizaron infecciones con los baculovirus bacEGFPVP2, bacVP6 y bacVP7, como se describe en Materiales y Métodos (secciones 4.5 y 4.6). Estas infecciones se realizaron a una MDI de 5 ufp/cel para cada baculovirus y se tomaron muestras de la infección cada 24 horas para determinar viabilidad y concentración celular (Fig. 5.1.). Los cultivos se cosecharon a las 72 horas, cuando la viabilidad celular fue menor de 30%.

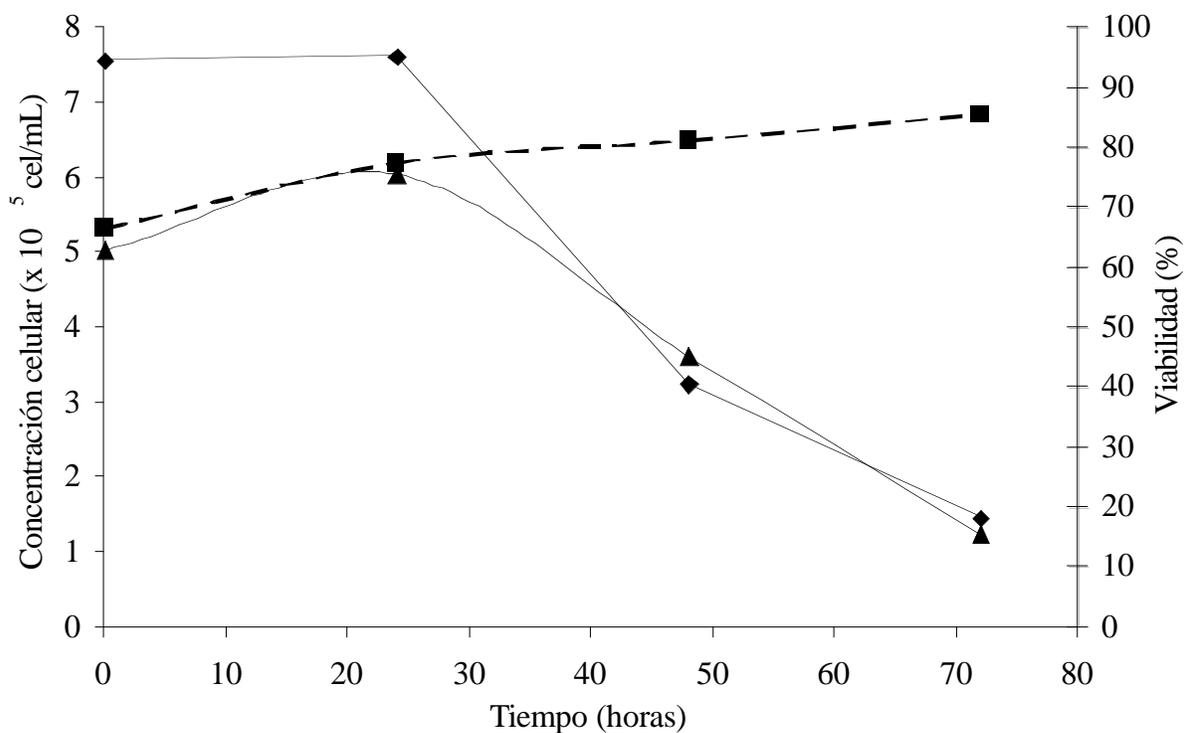


Figura 5.1. Cinética de infección de células High Five[®] con 3 baculovirus (bacEGFPVP2, bacVP6 y bacVP7). Se muestra la viabilidad celular (◆) en las diferentes horas post-infección (h.p.i.), la concentración celular total (■) y la concentración celular viable (▲).

En la Figura 5.1. se observa que hubo un pequeño incremento en la concentración celular después de la infección. Este pequeño incremento se debe a que no todas las células son

simultáneamente infectadas al tiempo 0, ya que la infección del baculovirus consiste en una serie de pasos limitados por el encuentro del virus-célula y algunos dependientes del ciclo celular (Palomares et al., 2006). Además en la figura 5.1. se observa que la viabilidad celular empezó a decaer desde las 24 horas, encontrándose a las 48 horas alrededor de 40% de viabilidad y a las 72 horas por debajo del 20%.

Las dIPPR se encuentran principalmente en el pellet celular (Mena, 2007). En el caso de la producción de tIPPR, se desconoce su ubicación, por lo fue necesario llevar a cabo la purificación del sobrenadante y pellet por separado.

5.1.1. PURIFICACION POR GRADIENTE DE CsCl

Los gradientes de CsCl son una herramienta ampliamente utilizada en virología para purificar cápsides virales. En principio, al no contar con una metodología alternativa a los gradientes de CsCl para la purificación de tIPPR en el grupo, se decidió utilizarla para la purificación de los estándares. Una de sus principales desventajas es que es un proceso difícil de escalar y además el producto obtenido contiene una gran cantidad de intermediarios (Gao et al., 2000; Auricchio et al., 2001; Mena et al., 2005, Gallo-Ramírez, 2007). El cultivo cosechado a las 72 horas se concentró mediante un colchón de sacarosa y se purificó utilizando un gradiente de CsCl, como se describe en la sección 4.6.1.1 (Crawford et al., 1994; Patton et al., 2000). En los gradientes de CsCl tanto de pellet como de sobrenadante, se observaron y recolectaron 4 bandas, las cuales se diafiltraron en una solución TNC y analizaron por Western blot (Fig 5.2). En las bandas 1 y 2 del gradiente de sobrenadante (carriles 2 y 3 del gel en la Figura 5.2.A) se observaron bandas que corresponden al peso molecular de las proteínas virales EGFPVP2 y VP6. No fue posible determinar la presencia de VP7 en estos análisis. La concentración de proteína total de las bandas 1 y 2 del gradiente fue de 50 µg/mL y 60 µg/mL respectivamente.

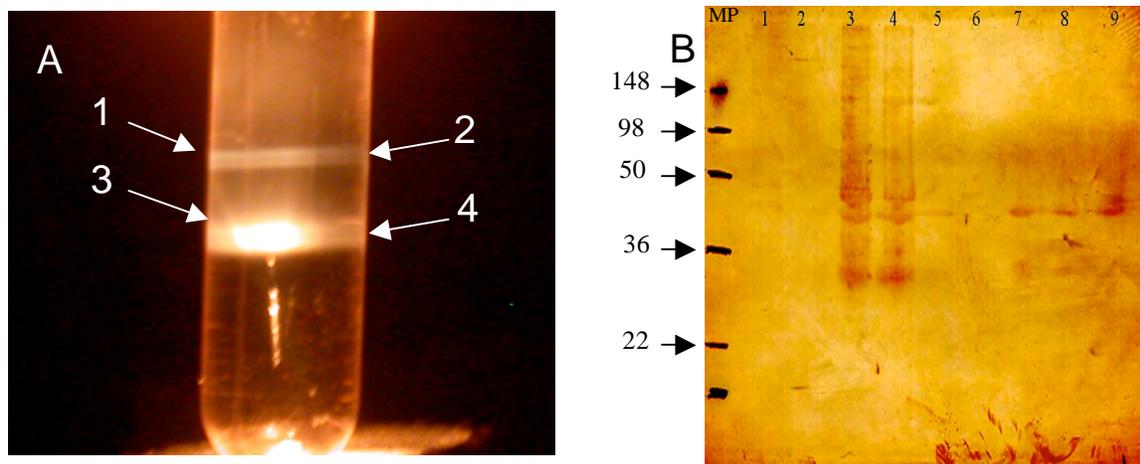


Figura 5.2. Western blot de muestras de gradientes de CsCl. Producción a MDI de 5 ufp/cel para cada baculovirus (MDI total de 15ufp/cel). MP) Marcador de peso molecular BenchMark™ 1) Muestra de VP6 purificada, 2) Muestra purificada de (dIPPR), 3) Sobrenadante banda 1, 4) Sobrenadante banda 2, 5) Sobrenadante banda 3, 6) Pellet banda 1, 7) Pellet banda 2, 8) Pellet banda 3, 9) Pellet banda 4. En cada carril se colocaron 1 µg/mL de proteína. Se utilizó como anticuerpo primario el anticuerpo anti-YM (1:2000).

Las bandas 1 y 2 del gradiente (Figura 5.2.A.) fueron analizadas en el HPLC. En la Figura 5.3 se observa el cromatograma de la muestra de la banda 1 recolectada del gradiente de CsCl de sobrenadante de cultivo. Se observa un pico en absorbancia (280 nm) y fluorescencia alrededor de los 14.7 minutos, el cual corresponde a las PPR como se describió en Mena y colaboradores (2005). Se analizó el área bajo la curva del pico correspondiente a PPR, así como de los otros picos que se observan en el cromatograma y se definió el % de pureza de la muestra (la pureza se define como la relación del área bajo la curva de PPR entre el área bajo la curva total del cromatograma), así como la concentración final de PPR. La pureza de la muestra fue del 5% y la concentración de 10 ng/mL (en cada uno de los análisis se determinó la relación 260/280 nm, para conocer la relación de ácido nucleíco/proteína en las mismas). El valor de la relación 260/280 del pico de PPR fue de 1.3 que corresponde a 90% de proteína y 10% de ácidos nucleícos (según tablas, Mach et al., 1995). La relación 260/280 de los otros picos del cromatograma estuvo entre 1.3 y 1.4, lo que corresponde a 85-90% de proteína en esos picos, y el resto ácidos nucleícos. Además, se corroboró la concentración de PPR en la muestra mediante la cuantificación de EGFPVP2 como se describe en Materiales y Métodos en la sección 4.7.

Como se comentó anteriormente, no fue posible determinar la presencia de VP7 en las muestras de cultivo, aunque los resultados de HPLC confirmaron la presencia de PPR en las mismas. Con

esto no es posible determinar la presencia de tIPPR. Se ha reportado que las dIPPR son inestables a concentraciones de calcio mayores a 10 mM y estables en soluciones sin calcio (Mena 2007). Por lo tanto, se utilizó un buffer con una concentración de calcio de 10 mM lo que nos sugiere que no habría dIPPR en la muestra (debido a un desensamblaje de la misma) y las PPR que observamos en el HPLC deberían ser tIPPR (Mena, 2007). Por este motivo, se decidió analizar el efecto del calcio en la purificación sobre las dIPPR, considerando que la purificación de tIPPR se realizó en TNC, cuya concentración de calcio es de 10 mM, se esperaba que la dIPPR en la muestra se desensamblara. Al realizar la purificación de tIPPR utilizando 30 mM de calcio no se observó una diferencia en el patrón de las bandas producidas en un gradiente de CsCl. Por esto, se realizó un experimento en ausencia de calcio en el que se utilizó una solución de 10 mM Tris pH 7.4 y 140 mM NaCl (TN) en la purificación de tIPPR, las cuales son condiciones de desensamblaje de las tIPPR y así determinar la presencia de estas estructuras en las muestras.

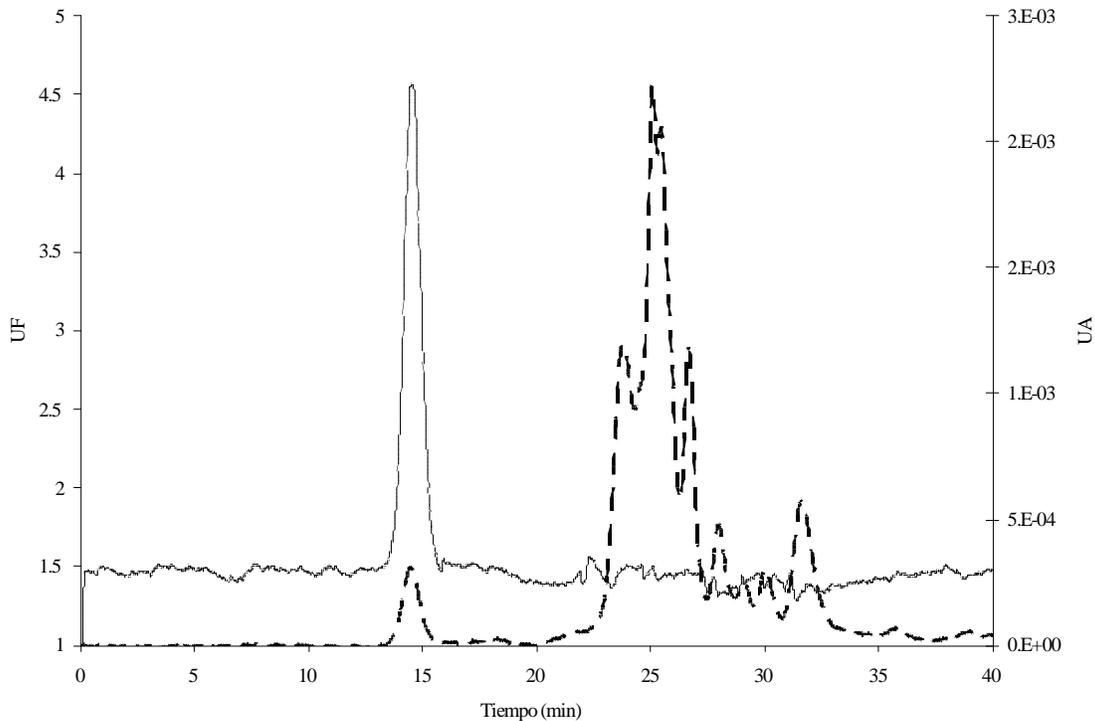


Figura 5.3. Cromatograma de la banda 1 del gradiente de CsCl. En línea punteada se observa la absorbancia (280 nm) y en la línea continua la fluorescencia ($\lambda_{ex}=484$ nm y $\lambda_{em}=510$ nm de EGFP). UA, unidades de absorbancia y UF, unidades de fluorescencia.

Un cultivo infectado con 3 baculovirus a una MDI de 1ufp/cel se cosechó a las 96 horas y se trató con el protocolo de purificación descrito en la sección 4.6.1.1. utilizando TNC como

solución. Las modificaciones en el procedimiento se realizaron después del colchón de sacarosa, resuspendiendo el pellet formado en TNC (tubo A) o en TN (tubo B). Como se puede observar en la Figura 5.4.A. se observaron las mismas bandas obtenidas en el gradiente mostrado en la Figura 5.2., mientras que en la Figura 5.4.B. se observó una banda solamente. Se recolectaron las bandas y se analizaron en un refractómetro. Las bandas 1 y 2 tuvieron una densidad de 1.359 g/cm³, la banda 3 de 1.360 g/cm³, banda 4 de 1.362 g/cm³ y finalmente la banda que se recolectó de la muestra sin calcio (banda 5) tuvo una densidad de 1.365 g/cm³. Las densidades obtenidas fueron muy similares a las reportadas por Crawford y colaboradores (1994) para PPR, siendo estas de 1.360 g/cm³ para la tIPPR y 1.380 g/cm³ para la dIPPR. Como se puede observar casi todas las bandas tuvieron una densidad similar a la reportada para la tIPPR, y analizando todas las bandas recolectadas en el HPLC, se observó la presencia de PPR en todas las bandas, aunque en la banda 1 es donde mayor concentración de PPR existe. Las muestras del gradiente se analizaron mediante tinción con plata de geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes y Western blot (Fig 5.5. y 5.6., respectivamente). La obtención de una sola banda en el gradiente de la muestra que fue purificada sin calcio fue el esperado (Fig. 5.4.B.), ya que está reportado el desensamblaje de las tIPPR cuando no existe calcio en el medio (Ruiz et al., 1996). Es importante señalar que al analizar por HPLC todas las bandas recolectadas, muestran la presencia de PPR.

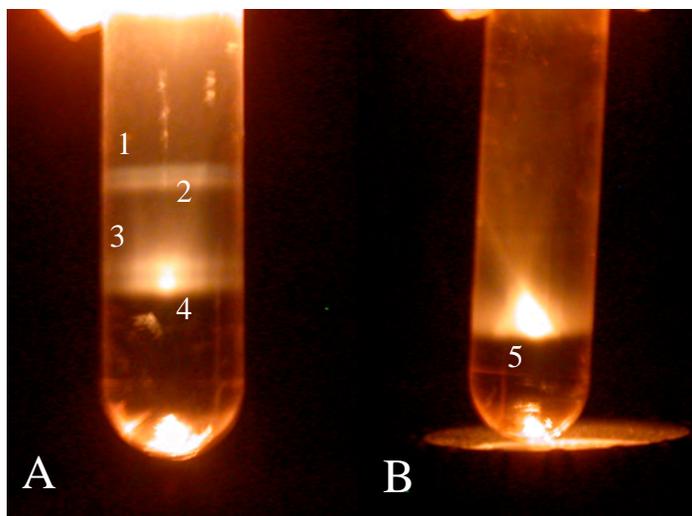


Figura 5.4. Gradientes de CsCl. A) Muestra en TNC B) Muestra en TN.

En la Figura 5.5. se muestra un gel de las muestras obtenidas de las bandas en los gradientes. En las muestras de las bandas 1 y 2 con calcio se observa una proteína de peso molecular de 45 kDa (VP6), otra de 38 kDa (VP7) y otra entre 100 y 120 kDa que corresponde a EGFPVP2. Además, observando los carriles 9 y 10, que corresponden a las muestras de pellet y sobrenadante de cultivo respectivamente, se puede observar la presencia de varias bandas adicionales a las proteínas virales de rotavirus, indicando que la purificación por gradientes de CsCl es sólo parcial.

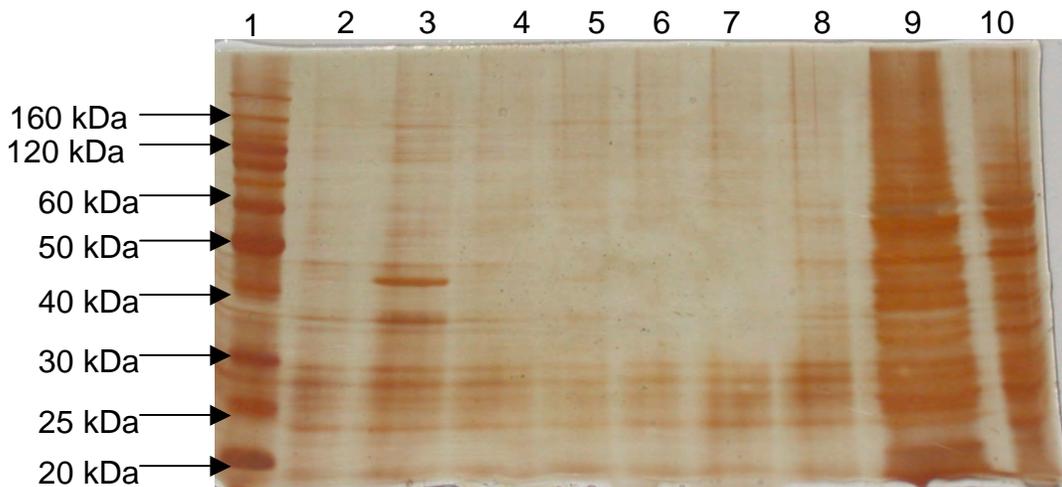


Figura 5.5. Tinción con plata de muestras purificadas por gradiente de CsCl. 1) Marcador de peso molecular BenchMark™, 2) Sobrenadante banda 1 (calcio), 3) Sobrenadante banda 2 (calcio), 4) Sobrenadante banda 3 (calcio), 5) Sobrenadante banda 4 (calcio), 6) Pellet banda 1 (calcio), 7) Pellet banda 2 (calcio), 8) Pellet banda 3 (calcio), 9) Pellet banda 5 (sin calcio) y 10) Sobrenadante banda 5 (sin calcio).

Para confirmar la presencia de las proteínas virales se realizó un Western blot (Fig. 5.6.). En los carriles 2 y 3 se observan las bandas correspondientes a las proteínas virales EGFPVP2, VP6 y VP7. Estos carriles corresponden a las bandas 1 y 2 de las muestras purificadas con calcio, y en los carriles 9 y 10 (muestras purificadas sin calcio) no se observaron las bandas correspondientes a las proteínas virales. Esto pudo deberse a la concentración de proteína cargada en el gel de las muestras en los carriles 9 y 10 (0.5 µg).

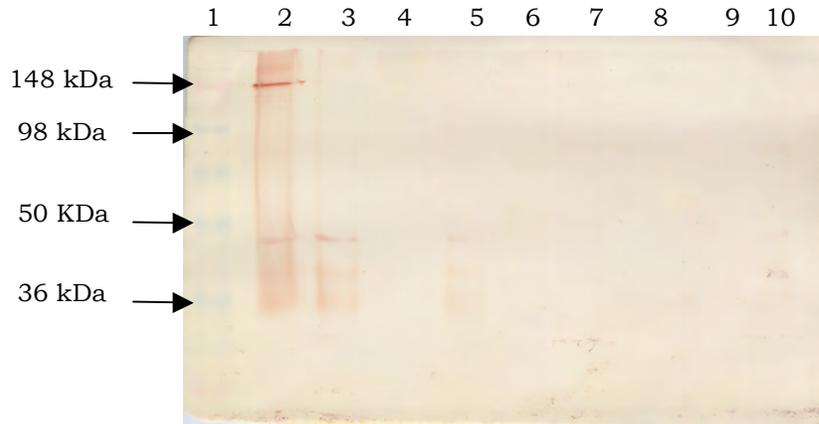


Figura 5.6. Western blot de las muestras purificadas por gradientes de CsCl. 1) Marcador de peso molecular See blue, 2) Sobrenadante banda 1 (calcio), 3) Sobrenadante banda 2 (calcio), 4) Sobrenadante banda 3 (calcio), 5) Sobrenadante banda 4 (calcio), 6) Pellet banda 1 (calcio), 7) Pellet banda 2 (calcio), 8) Pellet banda 3 (calcio), 9) Pellet banda 5 (sin calcio) y 10) Sobrenadante banda 5 (sin calcio). Anticuerpo anti-YM (1:2000).

La muestra de la banda 1 del gradiente se analizó por microscopía electrónica. En las micrografías (Fig. 5.7.) se observan estructuras de aproximadamente 75 nm que corresponden al tamaño reportado de las cápsidas de rotavirus (Crawford et al., 1994).

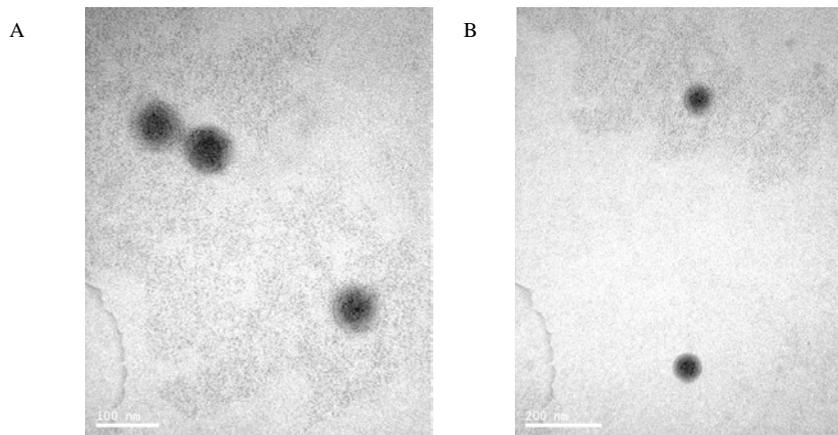


Figura 5.7. Micrografías electrónicas de transmisión de muestras de CsCl. En ambas se observan estructuras de aproximadamente 70-80 nm de diámetro. A) Amplificación a 85,000X, y B) 50,000X.

Con base en los análisis que se realizaron a las muestras purificadas por gradientes de CsCl, se confirmó la presencia de tIPPR en la muestra, con una pureza del 5% (análisis por HPLC).

5.1.2. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR

Con la finalidad de incrementar la pureza de la muestra de tIPPR, se decidió implementar el protocolo de purificación descrito por Peixoto y colaboradores (2007) el cual fue descrito en la sección 4.6.1.2. Para implementar esta metodología se infectaron células High Five[®] a una densidad celular de 0.5×10^6 cel/mL y una MDI de 1 ufp/cel para cada baculovirus. Esta MDI se definió con base en los resultados de Mena (2007), quien determinó la MDI con la que se obtiene la mayor concentración (0.1 o 1 ufp/cel de cada baculovirus). El cultivo se cosechó a las 96 horas y se procesó como se describió en Materiales y Métodos.

En la Figura 5.8 se observa el cromatograma de la purificación de tIPPR. Se recolectaron muestras cada 10 mL. Las muestras se concentraron mediante ultrafiltración utilizando cartuchos Centricón (Millipore, EUA) con un corte de 10 kDa. Las muestras concentradas de las diferentes fracciones recolectadas se analizaron con geles de poliacrilamida al 10% y su tinción con azul de Comassie (Fig. 5.9.).

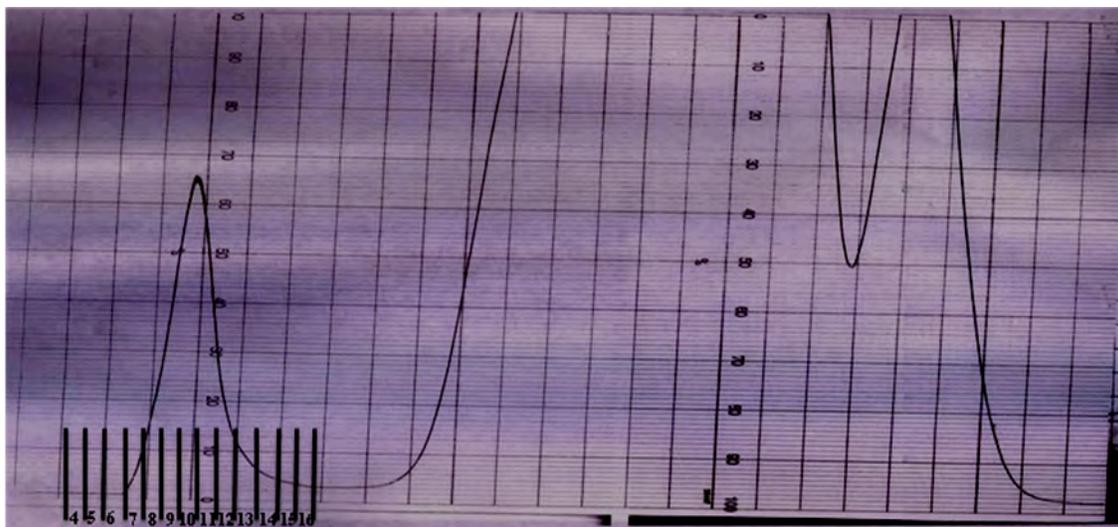


Figura 5.8. Cromatograma de la purificación de tIPPR por FPLC. La recolección de fracciones se inició 50 mL antes de la elución del primer pico y terminó hasta el final de la separación.

Al analizar los geles de las fracciones recolectadas en el FPLC, se observaron bandas alrededor de los 37 kDa en la mayoría de las fracciones, pero solamente en las fracciones 7 a 12 se observó una proteína con peso molecular alrededor de 120 kDa (correspondiente a EGFPVP2). Se logró

observar en todas las fracciones una proteína de alrededor de 37 kDa, que corresponde al peso molecular de VP7. Las fracciones que se muestran en los carriles 7 a 12 corresponden al pico 1 del cromatograma del FPLC, y ya que se observó la presencia de EGFPVP2 en esas fracciones así como VP7, se decidió recolectar ese pico en las posteriores purificaciones. Para confirmar la presencia de la tIPPR en las posteriores purificaciones se analizaron las muestras por Western blot, SDS-PAGE y microscopía electrónica, como se muestra en la Figura 5.10.

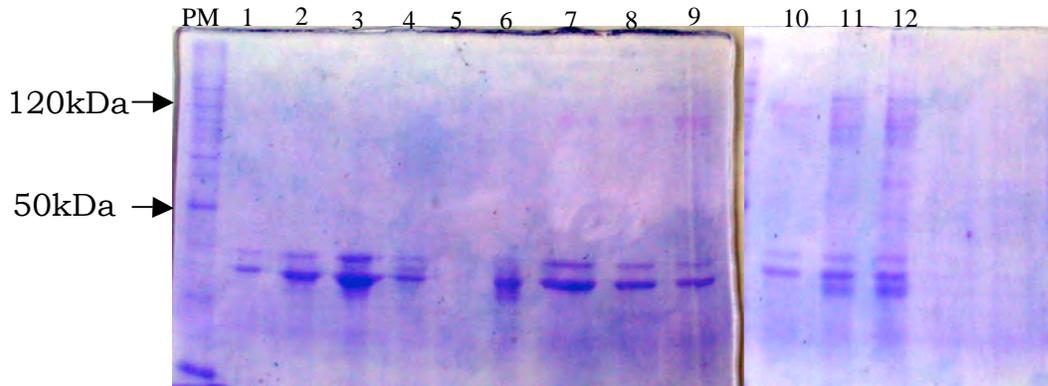


Figura 5.9. SDS-PAGE (10%) de fracciones recolectadas del FPLC. PM) Marcador de peso molecular Benchmark™, 1) Fracción 1, 2) Fracción 2, 3) Fracción 3, 4) Fracción 4, 5) Fracción 5, 6) Fracción 6, 7) Fracción 7, 8) Fracción 8, 9) Fracción 9, 10) Fracción 10, 11) Fracción 11, 12) Fracción 12.

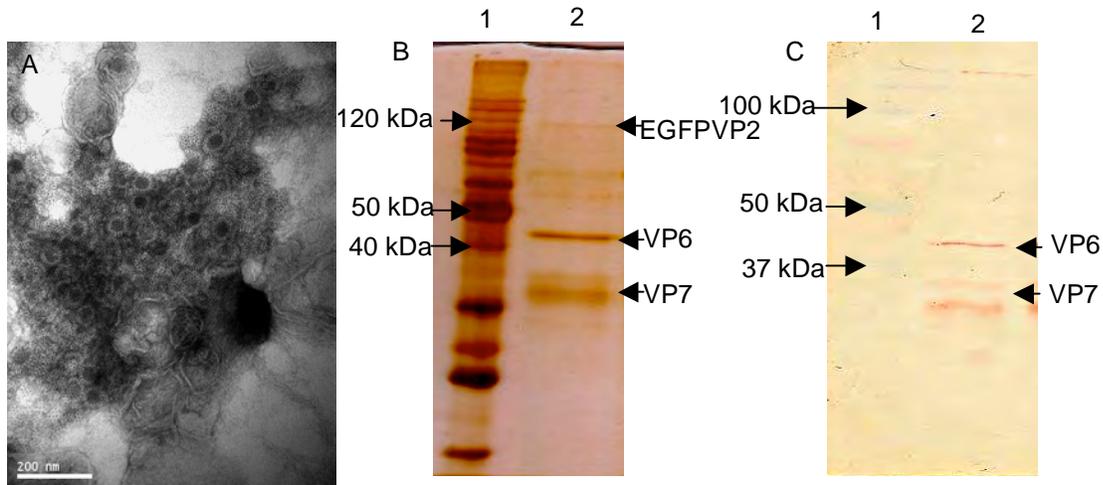


Figura 5.10. Análisis de la muestra purificada por FPLC. A) Microscopía electrónica, B) Gel de poliacrilamida teñido con plata (12%). 1) Marcador de peso molecular (BenchMark™), 2) tIPPR, C) Western blot. 1) Marcador de peso molecular (Dual Color), 2) tIPPR. Anticuerpo anti-YM (1:2000).

En los carriles 1 al 5 del gel de la Figura 5.9., que corresponden a las fracciones 1 a 5 de la purificación, también se observó una proteína de aproximadamente 37 kDa. Esas muestras no fueron analizadas más extensamente por la ausencia de EGFPVP2.

La Figura 5.10.A. muestra la micrografía electrónica de la muestra purificada por FPLC en la que se observaron partículas de diámetro aproximado de 70 nm, similar al reportado para las PPR. En la Figura 5.10.B. se observa el gel teñido con plata de la misma muestra, en la que se observan 3 bandas correspondientes a las proteínas virales EGFPVP2 (120 kDa), VP6 (46 kDa) y VP7 (37 kDa). Y por último, en la Figura 5.10.C. se observa el Western blot de esta muestra, con lo que se corroboró la presencia de las proteínas virales. No fue posible detectar la proteína EGFPVP2 utilizando el anticuerpo anti-VLP ni el anti-rotavirus YM. Sin embargo, se confirmó la presencia de EGFPVP2 en la PPR por la presencia de fluorescencia al analizar la muestra por HPLC (Fig. 5.11.). En el cromatograma se observó un pico que eluyó a los 15 minutos, que corresponde a PPR (como fue descrito en la sección 5.1.1). Se analizó el área bajo la curva de absorbancia de ese pico, así como su contenido de ácidos nucleicos, y fluorescencia para determinar la presencia de EGFPVP2 en las PPR. En el pico que corresponde a PPR, la relación 260/280 fue de 1.0, que corresponde a un 96% de proteína total y un 4% de ácidos nucleicos. En relación al resto del cromatograma (los otros picos que eluyen después de la PPR), la relación 260/280 fue de 2, lo que corresponde a un 100% de ácidos nucleicos. La pureza final de la muestra con base en proteína fue del 100%.

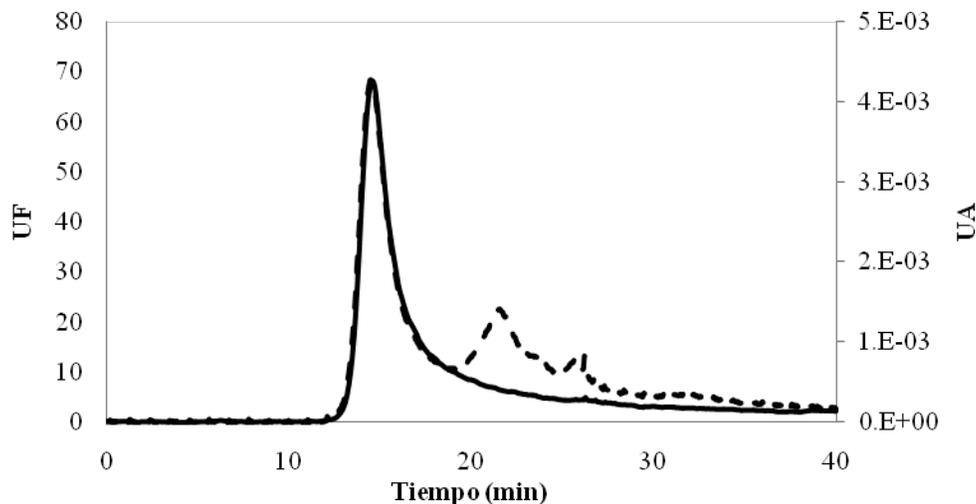


Figura 5.11. Cromatograma de HPLC de la muestra purificada por FPLC. En línea punteada se muestra la absorbancia (280 nm) y en la línea continua fluorescencia ($\lambda_{ex}=484$ nm y $\lambda_{em}=510$ nm de EGFP).

Mediante los análisis realizados a la muestra purificada por FPLC, se logró comprobar que la cromatografía nos proporciona un mejor material de trabajo (con base en la pureza) que los gradientes de CsCl.

5.2. PRODUCCIÓN Y PURIFICACIÓN DE dIPPR

La producción y purificación de dIPPR se realizó como se describe en las secciones 4.5. y 4.6.2., respectivamente. El cultivo infectado se cosechó a las 96 h.p.i. El sobrenadante y pellet celular se pre-purificaron en la etapa de dos fases acuosas para remover el baculovirus. Estas muestras después de ser diafiltradas en buffer 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8, se concentraron y se inyectaron en el FPLC. En la Figura 5.12 se observa el cromatograma de la purificación de dIPPR.

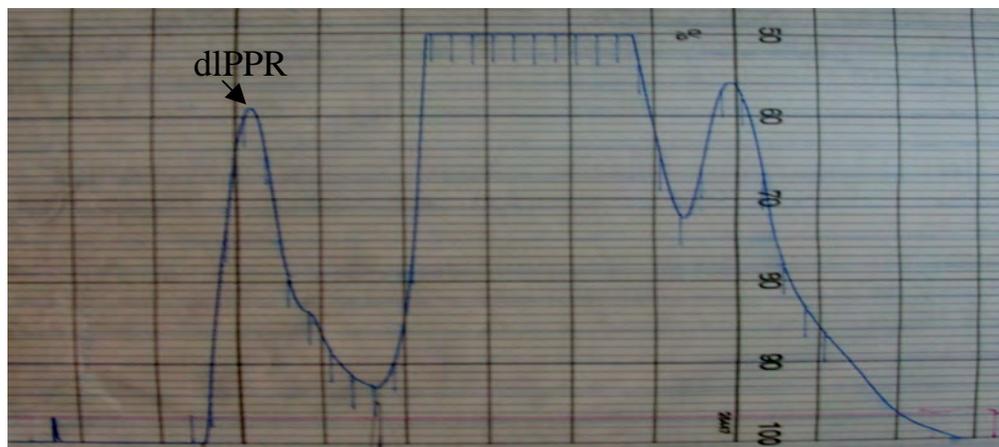


Figura 5.12. Cromatograma de la purificación de dIPPR por FPLC. El pico 1 corresponde a las dIPPR. Se midió absorbancia a 280 nm.

La purificación de dIPPR fue reportada por Mena (2007), el cual observó una elución de las dIPPR entre los 170 mL y 220 mL (primer pico). Debido a esto, se recolectó el primer pico en todas las purificaciones. Se analizaron las muestras por HPLC, SDS-PAGE y Western blot.

En la Figura 5.13. se observa el cromatograma de HPLC. El pico de dIPPR eluyó alrededor de los 15 minutos, además, se observaron dos picos eluyendo a los 24 y a los 30 minutos, respectivamente. Analizando las áreas bajo la curva de los 3 picos y su relación 260/280, se determinó que existe un 95% de proteína en el pico 1 y que no existe proteína en los picos posteriores (relación 260/280 nm de 2, que corresponde a un 100% de ácidos nucleicos). En la Figura 5.14.A. (Western blot) y 5.14.B. (SDS-PAGE) se pueden observar las bandas que corresponden a las proteínas VP6 (46 kDa) y EGFPVP2 (120 kDa), lo que corrobora la identidad y pureza de la muestra. Esta muestra fue utilizada en los diversos experimentos de diferenciación

y de desensamblaje, así como también fueron utilizadas algunas muestras purificadas anteriormente por Mena.

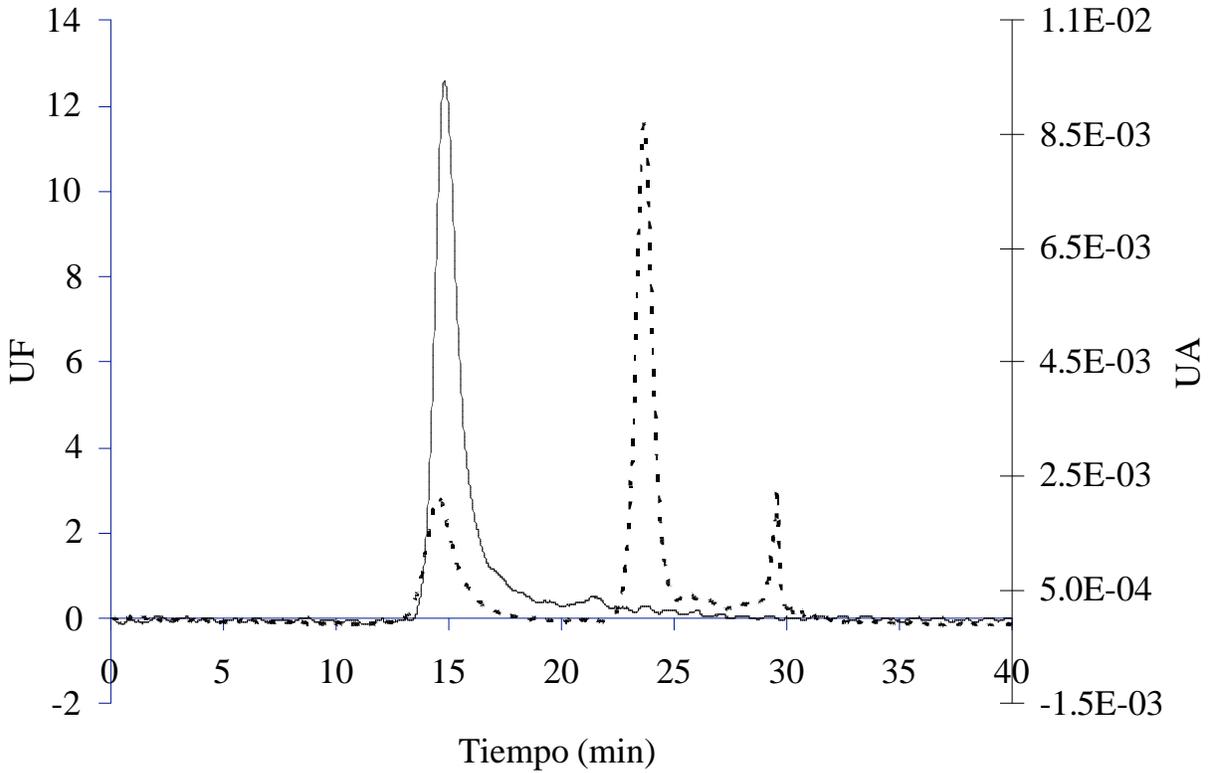


Figura 5.13. Cromatograma de HPLC de la muestra de dIPPR purificada por FPLC. En línea punteada se observa la absorbancia (280 nm) y en la línea continua la fluorescencia ($\lambda_{ex}=484$ nm y $\lambda_{em}=510$ nm de EGFP)

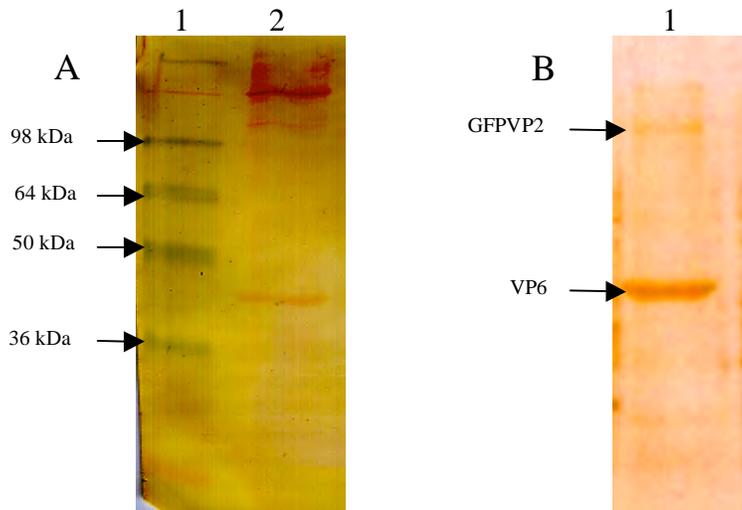


Figura.5.14. Análisis de dIPPR por western blot y SDS-PAGE. A) Western blot de dIPPR. 1) Marcador de peso molecular (Dual color), 2) dIPPR, B) SDS-PAGE. 1) dIPPR.

5.3. DIFERENCIACIÓN DE dlPPR Y tlPPR

El principal problema que encontramos al purificar y cuantificar tlPPR, es la presencia de dlPPR. No es una tarea sencilla purificar y diferenciar la dlPPR y tlPPR ya que la diferencia de tamaños entre ambas estructuras es de 5 nm. Se realizaron diversos experimentos para lograr diferenciarlas. Primero se analizaron muestras purificadas de PPR por HPLC, utilizando las columnas de exclusión molecular Ultrahydrogel 2000 y 500 instaladas en serie con la finalidad de separarlas por su diferencia de tamaño. La segunda metodología que se implementó fue desensamblar la dlPPR utilizando soluciones con alto contenido de calcio (50 mM) e incubar a 37°C hasta por 5 horas con la fin de cerciorarse que sólo hay tlPPR en la muestra. La tercera metodología fue implementar la electroforesis capilar en sus modalidades de isoelectroenfoque y zonal, con la finalidad de diferenciarlas y cuantificarlas utilizando sus diferentes relaciones de punto isoeléctrico (pI) y carga/masa, respectivamente (no se ha determinado aún el pI y la relación carga/masa de las PPR).

5.3.1. HPLC

Las muestras de PPR para estos experimentos fueron purificados como se describe en la sección 4.6.1.1. en el caso de las tlPPR, y las dlPPR fueron proporcionadas por el Dr. Jimmy Mena. Las condiciones de separación en el HPLC fueron idénticas a las utilizadas en los anteriores análisis. En la Figura 5.15.A. se observa el cromatograma de las tlPPR purificadas, en 5.15.B las dlPPR purificadas, en 5.15.C. el cromatograma superpuesto de las dos PPR con la finalidad de observar si existía una diferencia de elución entre estas dos estructuras, y en D el cromatograma de una mezcla de dlPPR y tlPPR (30 µg/mL de tlPPR y 30 µg/mL de dlPPR). Los cromatogramas 5.15.C. y 5.15.D. muestran que no existe separación entre las dlPPR y tlPPR. Como se observa en los cromatogramas, la diferencia en la elución de ambas estructuras fue de 0.1 minutos. Una diferencia de elución tal no es significativa y puede deberse a la concentración de sales en las muestras (Mena et al., 2005). Al inyectar una mezcla de ambas PPR no se observó separación, confirmando con la falta de resolución. Esto indica que utilizando la cromatografía líquida de alta presión y columnas de exclusión en gel de tamaño de poro de 200 nm y 50 nm instaladas en

serie, no es posible diferenciar entre las dIPPR y tIPPR, por lo que es necesario implementar otra metodología.

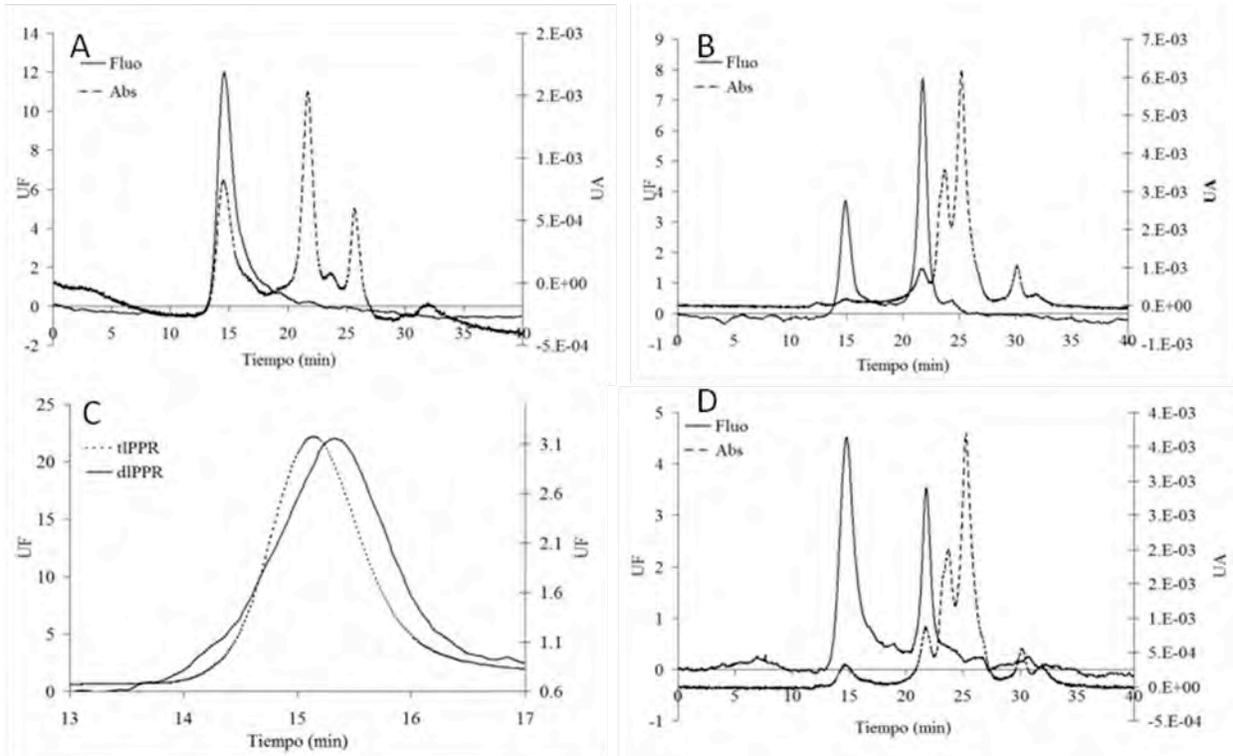


Figura 5.15. Diferenciación de PPR por HPLC. A) Muestra de tIPPR. B) dIPPR. C) Cromatograma sobrepuestos de dIPPR y tIPPR analizadas por separado. D) Mezcla de dIPPR y tIPPR. Las líneas punteadas en los cromatogramas A, B y D esquematiza absorbancia a 280 nm y las líneas continuas fluorescencia a λ_{ex} de 484 nm y λ_{em} de 510 nm. En el cromatograma C la línea punteada esquematiza tIPPR y la línea continua dIPPR.

5.3.2. DESENSAMBLAJE DE LA dIPPR

En nuestro grupo de investigación se ha determinado que a concentraciones por arriba de 10 mM de calcio se desestabiliza la dIPPR, desensamblándose en las estructuras proteicas que la conforman (sIPPR y VP6) (Mena, 2007). Al incrementar la concentración de calcio, las velocidades de desensamblaje también se incrementan. Ruiz y colaboradores (1996), determinaron las concentraciones de calcio en que las tIPPR son estables, las que son diferentes para cada cepa y están en el rango de 20 nM a 600 nM. Esto permite utilizar concentraciones de calcio por arriba de 10 mM para tener estructuras de triple capa estables, y disminuir la presencia de las dIPPR en la muestra. En la Figura 5.16. se muestra el análisis por HPLC de una muestra de dIPPR incubada con 50 mM de CaCl_2 durante 10 horas a 37°C.

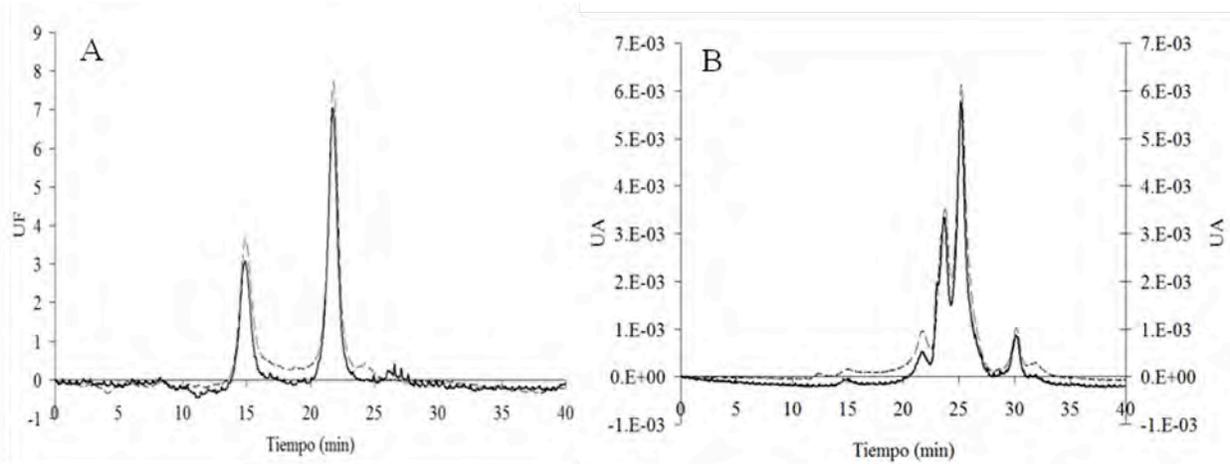


Figura 5.16. Desensamblaje de dIPPR analizado por HPLC. En línea punteada se observa la dIPPR y en línea continua la muestra de dIPPR incubada con 50 mM de calcio. A) Fluorescencia $\lambda_{ex}=484$ nm y $\lambda_{em}=510$ nm. B) Absorbancia a 280 nm.

En la Figura 5.16. no se observó diferencia entre el cromatograma de las dIPPR incubadas con calcio y las que no fueron incubadas. El estudio de desensamblaje de las dIPPR realizado por Mena (2007) se hizo utilizando un equipo de dispersión de luz estática (ya que las partículas de mayor tamaño dispersan más luz es posible seguir cinéticas de ensamblaje y desensamblaje), en el cual se monitorea en línea el desensamblaje de las dIPPR, con lo que se concluyó que sí existe desensamblaje bajo estas condiciones. Una posible explicación para este comportamiento observado en los cromatogramas, es que las proteínas de la cápside interna (EGFPVP2) tienen la capacidad de aglomerarse, lo que ya ha sido reportado por Labbé y colaboradores (1991), y que podría explicar el porqué no se observó por HPLC una diferencia cuando se realizó el desensamblaje de las dIPPR. Para solventar este problema se realizó el desensamblaje de las dIPPR adicionando a la mezcla de reacción Tritón X-100 al 0.5%, lo que evitaría la aglomeración de nucleocápsides (Zeng et al., 1998). El resultado fue similar al mostrado en la Figura 5.16, aunque no se descarta la agregación de nucleocápsides, solamente que bajo estas condiciones no fue posible desagregarlas o que el radio hidrodinámico de la nucleocápside es similar al de las tIPPR y por ende tiene un tiempo de elución similar.

5.3.3. ELECTROFORESIS CAPILAR

Se empleó la electroforesis capilar con la finalidad de diferenciar entre la dIPPR y tIPPR con base en su diferencia en la relación carga/masa (electroforesis capilar zonal, ECZ), así como

también la diferencia en sus puntos isoeléctricos (pI) (electroforesis capilar por isoelectroenfoque, ECI). Los pI de las proteínas virales de rotavirus aún no han sido determinados experimentalmente, por lo que se obtuvieron los pI teóricos analizando la secuencia de aminoácidos mediante el software Protein Calculator v3.3, siendo de 6.16 para VP6 y de 4.8 de VP7. Se consideraron tanto la proteína VP6 y VP7 ya que son las que se encuentran en el exterior de las cápsidas tanto de dlPPR (VP6) y tlPPR (VP7), respectivamente.

La elección del capilar utilizado se hizo considerando que las partículas pueden interaccionar con el mismo, por lo que en principio se utilizaron capilares recubiertos de diversos materiales como PVA (polivinil alcohol) y poliacrilamida (Chiari et al., 1996), así como sin recubrir (sílica fundida). La elección de la solución de separación es fundamental, ya que el pH determina la movilidad de las partículas (Kremser et al., 2007). Se decidió utilizar buffer de fosfatos a diferentes pH adicionando surfactantes (deoxicolato de sodio y SDS) para evitar la interacción de las partículas con el capilar (Kremser et al., 2007). Las muestras que se utilizaron para estos experimentos fueron purificadas como se describe en la sección 4.6.1.2. y 4.6.2. La pureza de las muestras puede corroborarse en la sección 5.1.2. y 5.2.

5.3.3.1. ELECTROFORESIS CAPILAR POR ISOELECTROENFOQUE

Esta metodología permite separar proteínas mediante la diferencia en sus pI. La muestra se inyecta al capilar y éste se coloca entre dos electrodos. Las soluciones que generan el gradiente de pH son una de 50 mM H₃PO₄ y otra de 10 mM NaOH. Posterior a la inyección, se realiza una separación de las proteínas por voltaje para que estas se agrupen en zonas discretas del capilar que coincide con su pI. Después de que se ha realizado la separación por pI, se procede a eluir las proteínas mediante presión a un voltaje constante, con la finalidad de evitar su dispersión en el capilar, y a su vez, lograr que las proteínas migren hacia el detector. Para determinar el pI de una muestra de interés, es necesario realizar una curva de calibración con estándares de pI conocidos (Fig. 5.17.). Estos estándares fueron ribonucleasa A (pI 9.45), anhidrasa carbónica (pI 5.9), lactoglobulina (pI 5.1) y el péptido CCK (pI 2.75) (Beckman Coulter, USA).

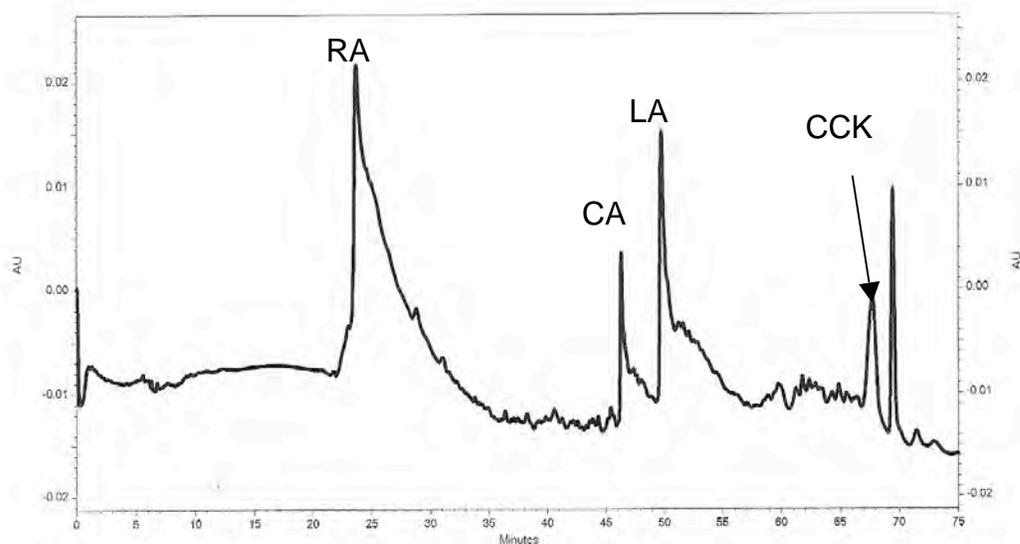


Figura 5.17. Curva de calibración de pI. ribonucleasa A (RA, pI 9.45), anhidrasa carbónica (CA, pI 5.9), lactoglobulina (LA, 5.1) y el péptido CCK (pI 2.75).

La curva de calibración (Fig. 5.18.) se obtuvo graficando el tiempo de migración de los estándares contra su pI. Las muestras de tIPPR se inyectaron posteriormente a diferentes concentraciones, desde 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ hasta 1.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Cuando se inyectó la muestra a 0.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ no se observó nada en el electroferograma, probablemente porque la concentración de la muestra fue baja (Fig.5.19.A.). A la concentración de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ o mayores, se observaron muchos picos en el electroferograma y la línea base subió (Fig. 5.19.B.). En la Figura 5.20.B. se observa el electroferograma de la corriente a lo largo del análisis de la muestra a 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ el cual es diferente a un electroferograma de corriente de una corrida típica, lo que indica un problema en la corrida (5.20.A.). Esto puede deberse a varios problemas, la posible presencia de burbujas en la muestra que se inyectó (la cual siempre se filtraba y se centrifugaba a 7,000 x g durante 3 minutos para evitar burbujas), y otro, a una precipitación de las proteínas debido a que estas se agrupan en zonas discretas del capilar, haciendo que la concentración de proteína se incremente más de 200 veces en esa zona, lo que puede producir la precipitación de la misma (Righetti et al., 1996). El otro posible problema, es que el diámetro del capilar no fuera lo suficiente grande para resolver estructuras del tamaño de las PPR, ya que si estas llegasen a aglomerarse y/o interactuar con las paredes del capilar, pueden precipitar y tapar el capilar.

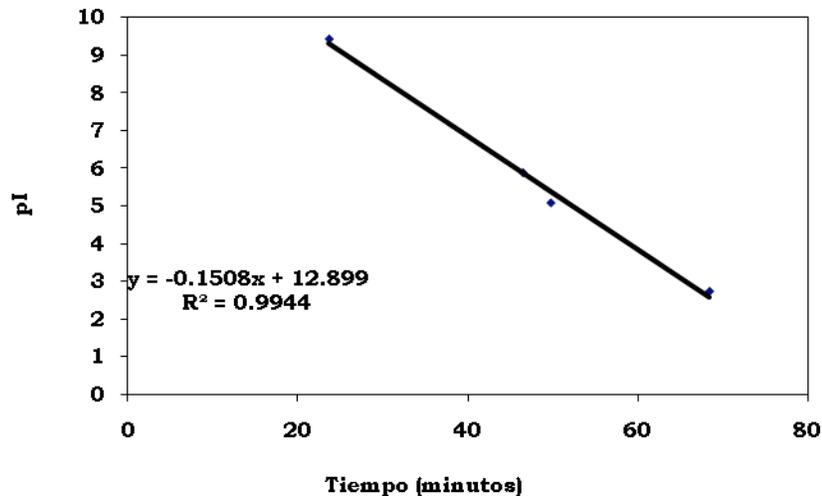


Figura 5.18. Curva estándar para el cálculo de punto isoeléctrico.

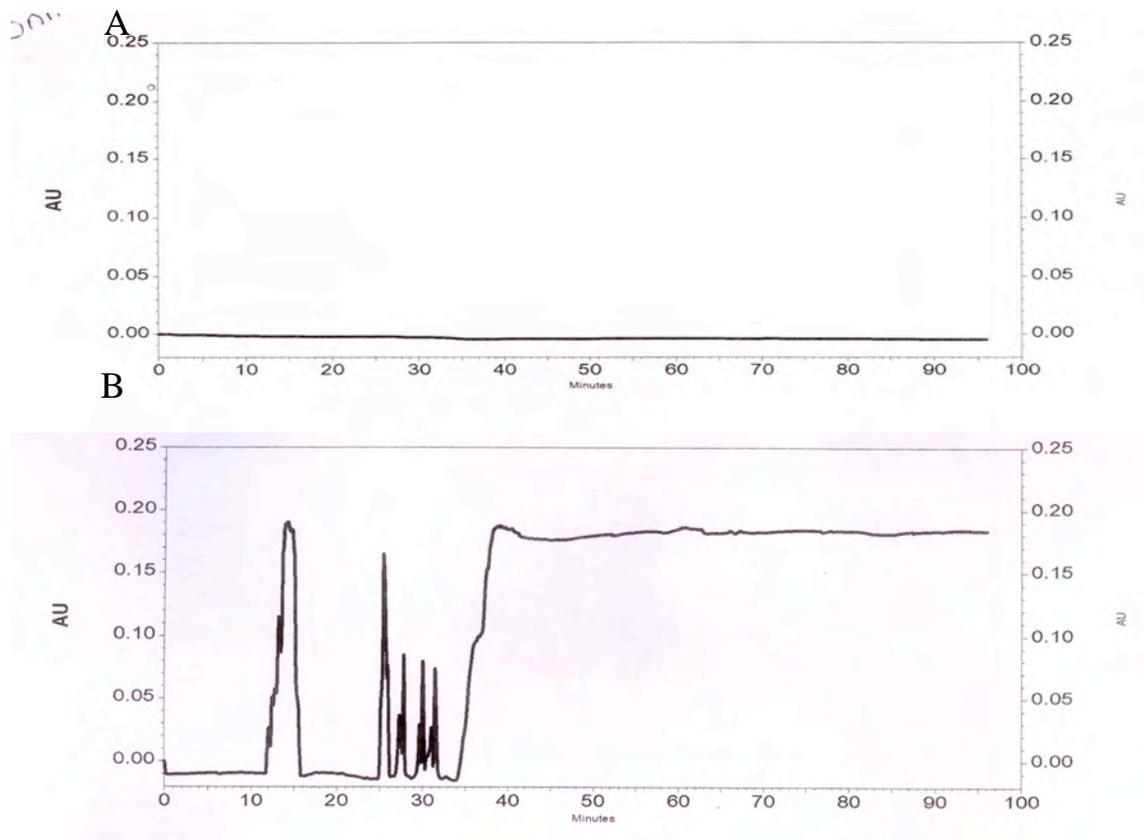


Figura 5.19. Análisis de tPPR por ECI. A) Electroferograma de tPPR a 0.3 $\mu\text{g/mL}$. B) Electroferograma de tPPR a 0.5 $\mu\text{g/mL}$.

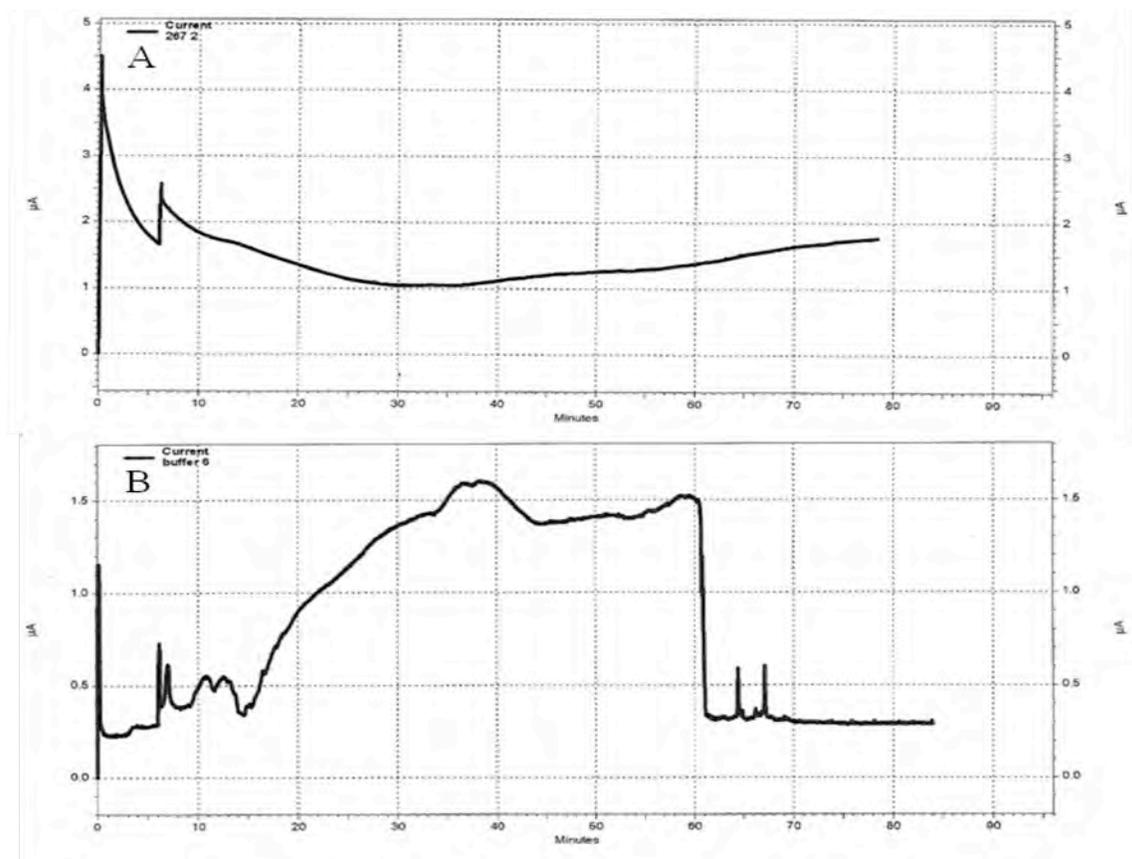


Figura 5.20. Corriente durante corrida por isoelectroenfoque. A) Electroferograma de tIPPR a 0.3 µg/mL. B) Electroferograma de tIPPR a 0.5 µg/mL.

5.3.3.2. ELECTROFORESIS CAPILAR ZONAL

Esta metodología, como se comentó anteriormente, permite separar estructuras con base en diferencias de su relación carga/masa. Para realizar las separaciones se utilizaron capilares de sílica fundida, o recubiertos con polivinilalcohol (PVA) o poliacrilamida de diferentes longitudes (capilar neutro). Una de las características importantes en la separación por ECZ es determinar el flujo electrosmótico (FEO), el cual se origina cuando un electrolito entra en contacto con una superficie sólida cargada. Esto produce que los iones presentes sean desplazados hacia el cátodo y arrastren solvente con ellos (Camilleri, 1998). El utilizar un capilar neutro que impide el flujo electrosmótico al no estar en contacto los grupos silanol con el electrolito. En cambio, en un capilar de sílica fundida en ocasiones es necesario un marcador para observar el FEO.

5.3.3.2.1. CAPILAR RECUBIERTO (NEUTRO)

En la separación que se realizó de las dIPPR y tIPPR con el capilar neutro, se analizaron diferentes pH (ya que la carga de las proteínas depende del pH). A los diferentes pH analizados (de 5.5 a 8) no se logró observar una diferencia significativa entre los tiempos de migración de las PPR analizadas por separado. Cuando se realizaron inyecciones de mezclas de dIPPR y tIPPR estas comigraron, por lo que no se logró resolver entre ambas PPR. Se ha reportado que las PPR tienden a aglomerarse, lo que podría explicar la comigración de los análisis por CZE (Peterson et al., 2006). En la Figura 5.21. se muestran los electroferogramas de las muestras de dIPPR y de tIPPR inyectadas por separado utilizando el buffer de separación a pH 8. Utilizando un capilar neutro no es necesario la adición de óxido de mesitilo para determinar el FEO (ya que estos capilares lo evitan al tener recubiertos los grupos silanol). Todas las muestras a excepción de algunas mezclas de dIPPR y tIPPR se prepararon agregando de ácido fólico como estándar interno (EI) a una concentración entre 5 y 30 $\mu\text{g/mL}$ dependiendo de la concentración de la muestra de PPR a analizar. Se puede observar en la Figura 5.21. que aunque hubo una pequeña diferencia entre los tiempos de migración de las PPR (Figuras 5.21.A. y B.), al inyectar una mezcla de dIPPR y tIPPR estas comigraron en el primer pico del electroferograma. Para determinar si este capilar podía ser útil en otras condiciones, se probaron otros pH. La separación realizada a pH 7 tuvo el mismo comportamiento que a pH 8 (Fig. 5.22.). En contraste con los pH mayores, a pH 6.5 no se observó algún pico definido (Fig. 5.23.). A pH 5.5. si se observaron picos correspondientes a PPR, pero una vez más fue imposible diferenciar entre ambas estructuras. El comportamiento observado a pH 6.5 podría ser resultado de una inestabilidad de las PPR en esas condiciones, aunque aún son necesarios más experimentos para explicar este hecho.

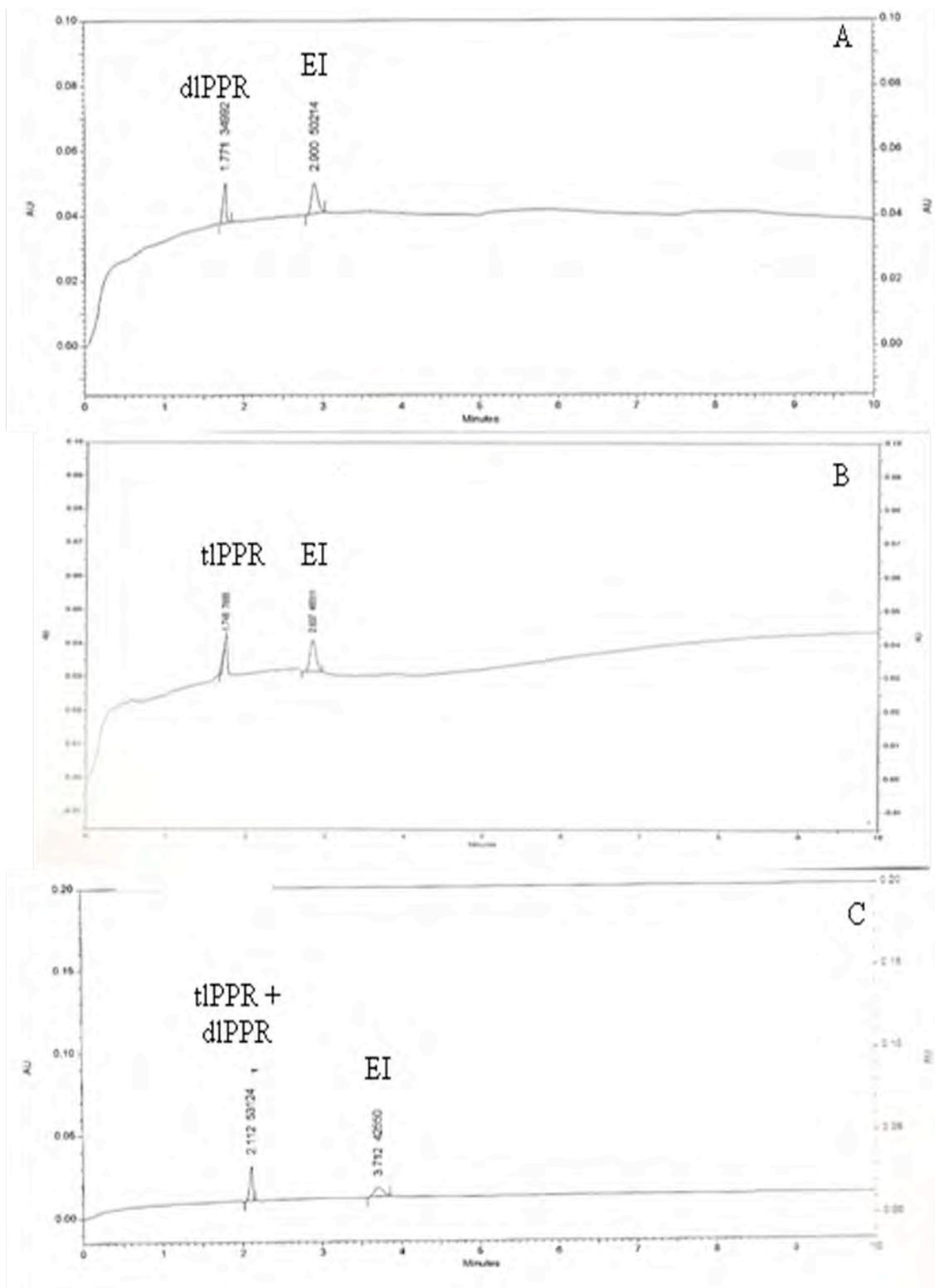


Figura 5.21. Electroferogramas de dIPPR y tIPPR, pH 8.0. Separación a 30kV en capilar neutro. A) Electroferograma de la muestra de dIPPR, B) Electroferograma de la muestra de tIPPR, C) Electroferograma de la mezcla de tIPPR y dIPPR en una relación 1:1.

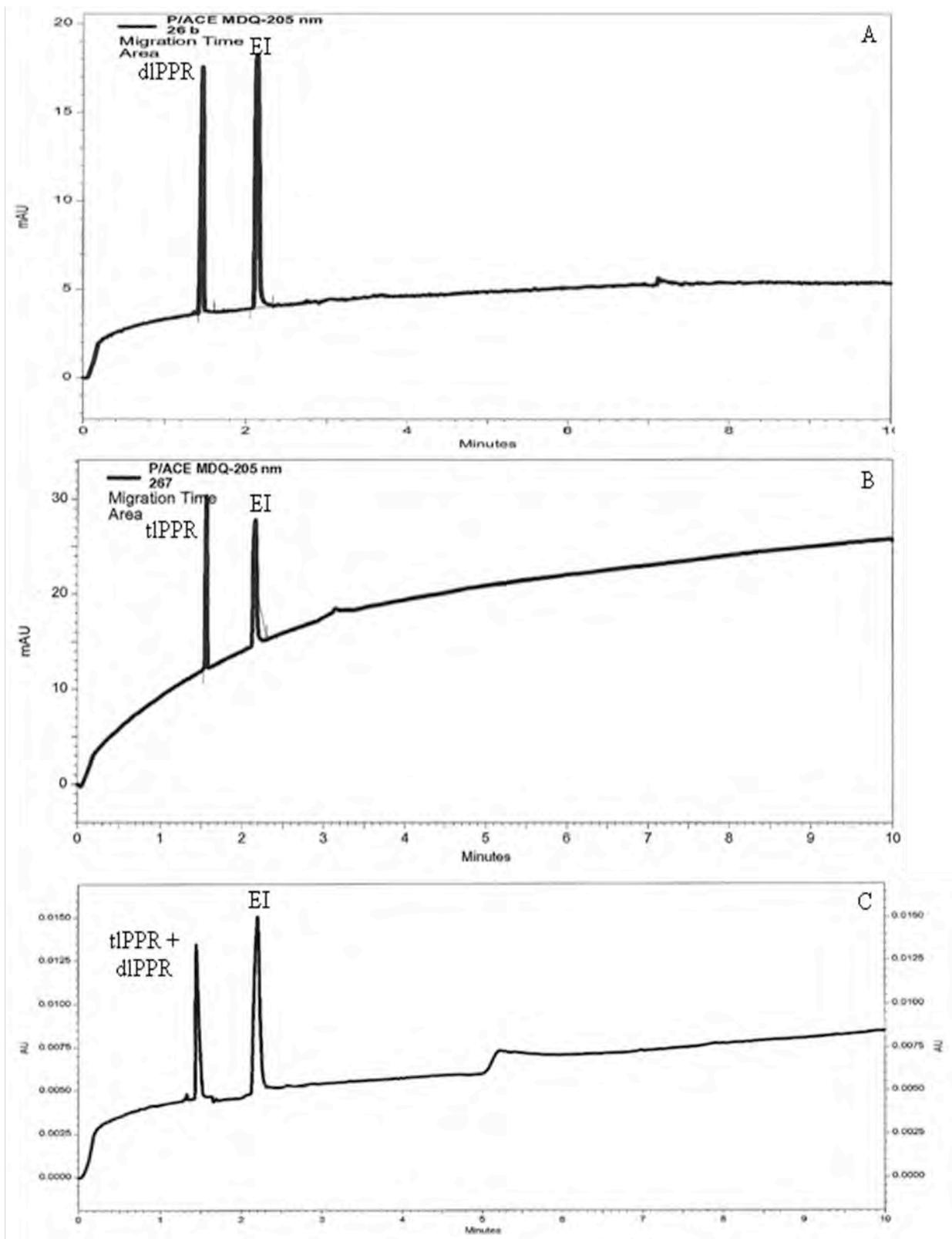


Figura 5.22. Electroferogramas de dIPPR y tIPPR, pH 7.0. Separación a 30kV en capilar neutro. A) Electroferograma de la muestra de dIPPR, B) Electroferograma de la muestra de tIPPR, C) Electroferograma de la mezcla de tIPPR y dIPPR en una relación 1:1.

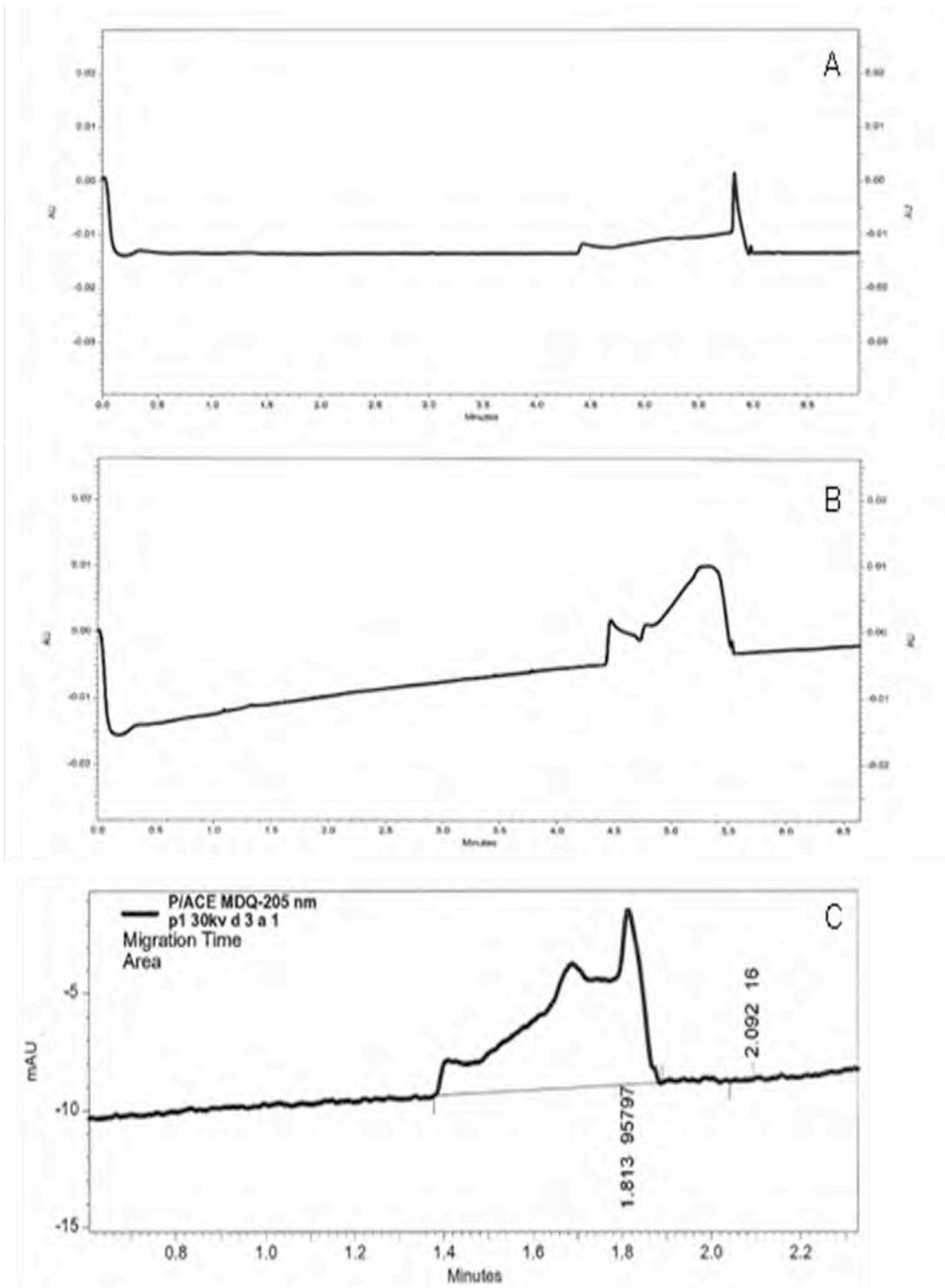


Figura 5.23. Muestras de PPR analizadas utilizando una solución de fosfatos pH 6.5 a 10 kV en capilar neutro. A) Electroferograma de la muestra de tIPPR. B) Electroferograma de la muestra de dIPPR. C) Electroferograma de la mezcla de dIPPR y tIPPR en relación 1:3. No se agregó EI para evitar posibles interacciones con las muestras.

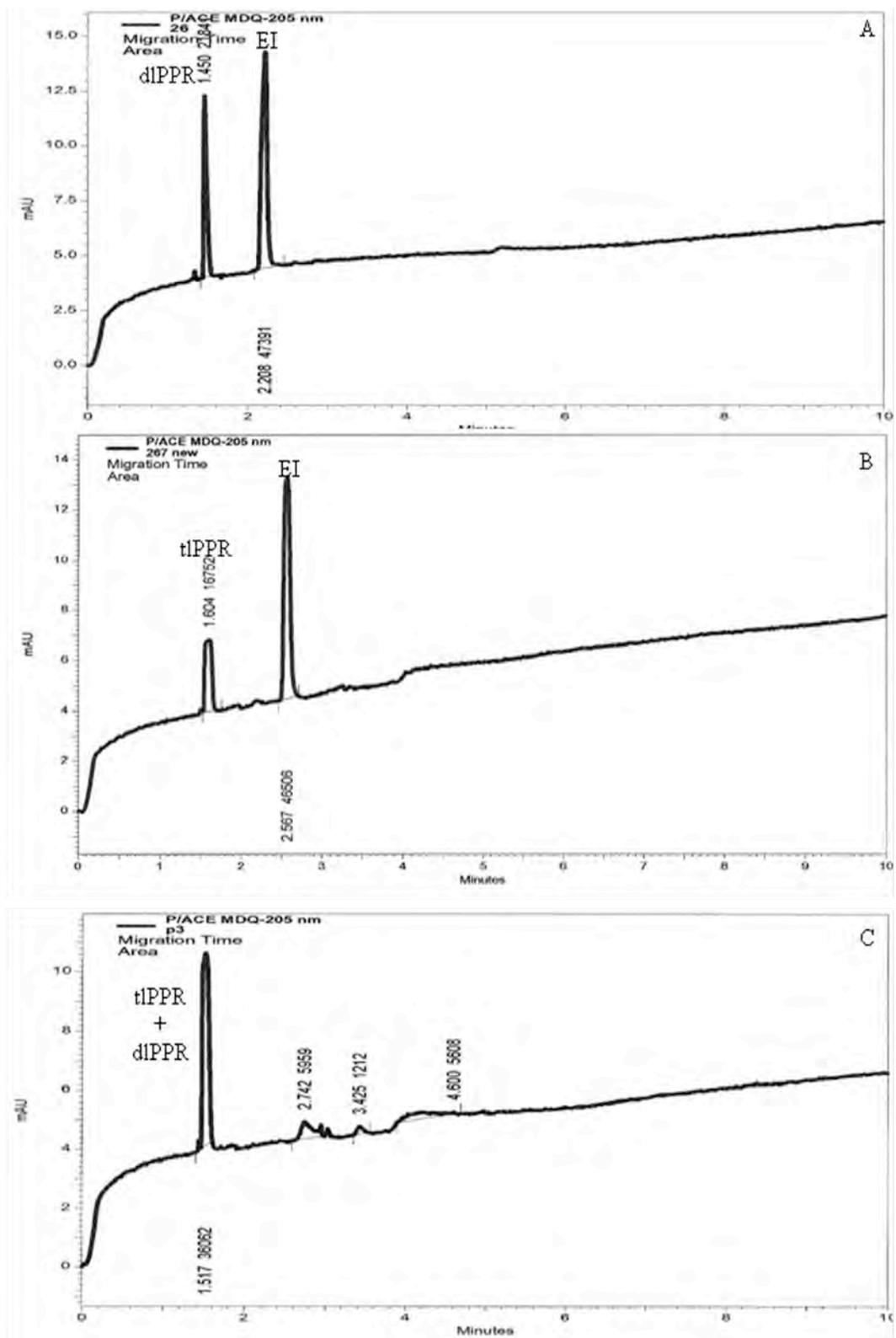


Figura 5.24. Muestras de PPR analizadas utilizando una solución de fosfatos pH 5.5 a 25 kV en capilar neutro. A) Electroferograma de la muestra de dIPPR. B) Electroferograma de la muestra de tIPPR. C) Electroferograma de la mezcla de dIPPR y tIPPR en relación 1:3.

5.3.3.2.2. CAPILAR DE SÍLICA FUNDIDA

Las separaciones utilizando el capilar de sílica fundida se realizaron a pH 8.0 y 25 kV en todas las corridas. La inyección de la muestra fue por presión, utilizando 0.7 psi durante 10 segundos, lo que corresponde con un volumen de inyección de 29.42 nL de muestra. En la Figura 5.25. se muestra el electroferograma de dIPPR, en el cual se puede observar el FEO (el pico de absorbancia negativa que se observa antes del pico de dIPPR es característico del FEO). Se determinó la μ_{ef} , la cual fue de 0.930 Ti. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

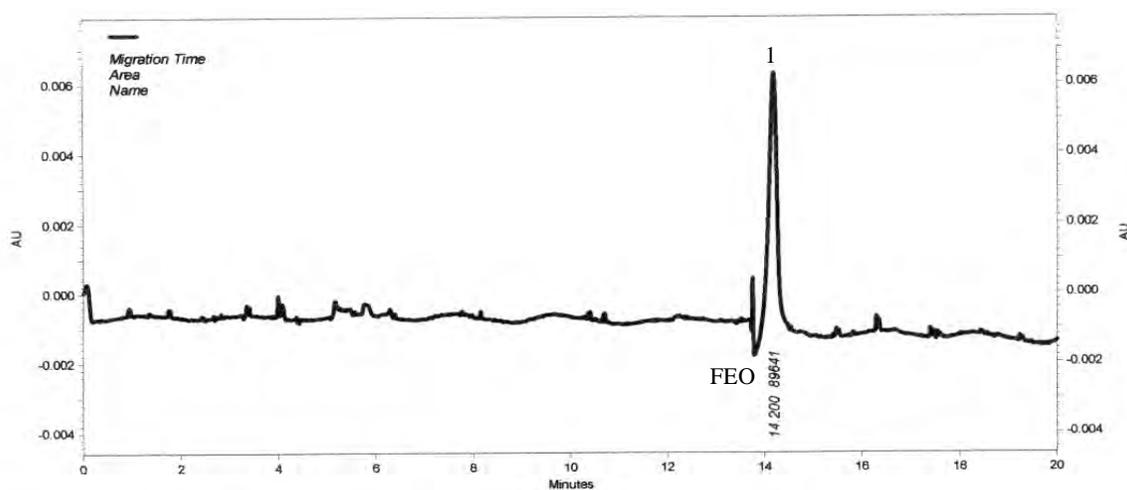


Figura 5.25. Migración de la dIPPR en el capilar de sílica fundida a 25 kV.

En la Figura 5.26. se muestra el electroferograma de la tIPPR, en el que se observan dos picos después del FEO. Las μ_{ef} de estas dos estructuras fueron de 1.235 ± 0.037 Ti y 2.946 ± 0.0275 Ti para el primero y el segundo pico, respectivamente. La μ_{ef} del primer pico fue similar a la calculada para la muestra que contiene sólo dIPPR. La abundancia relativa de ambos picos fue de 30% y 70% para el pico 1 y 2, respectivamente. En la muestra de tIPPR se esperaba solamente observar un pico que correspondiera a tIPPR, la presencia de otro pico podría indicar la contaminación de la muestra probablemente por dIPPR.

Para identificar y diferenciar los picos correspondientes a dIPPR y tIPPR en la muestra de tIPPR, se inyectaron mezclas de dIPPR y tIPPR a diferentes concentraciones. Las mezclas que se realizaron fueron al 1:2 y 1:1 (dIPPR:tIPPR) (Ver Figuras 5.27. y 5.28.).

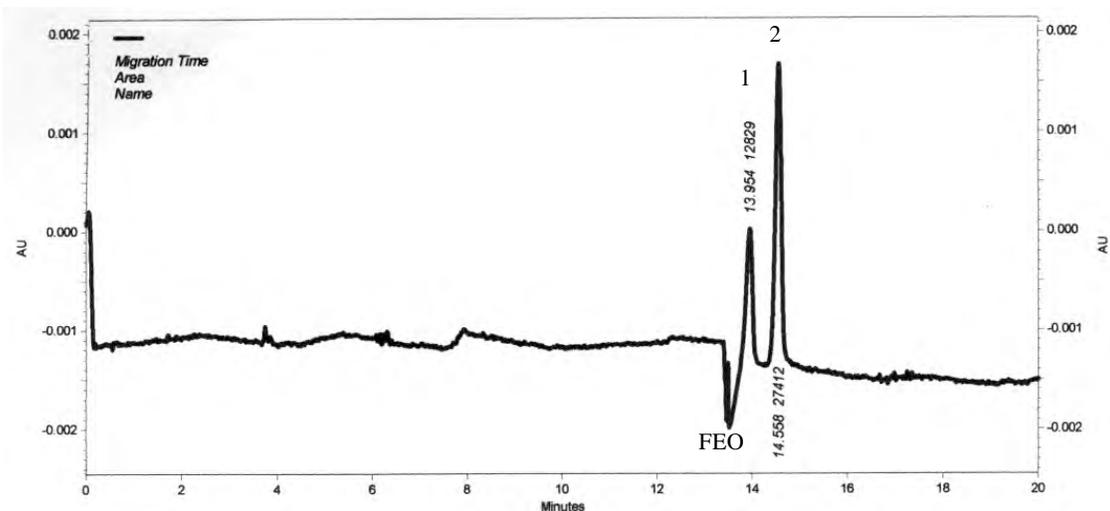


Figura 5.26. Migración de la tIPPR en el capilar de sílica fundida a 25 kV.

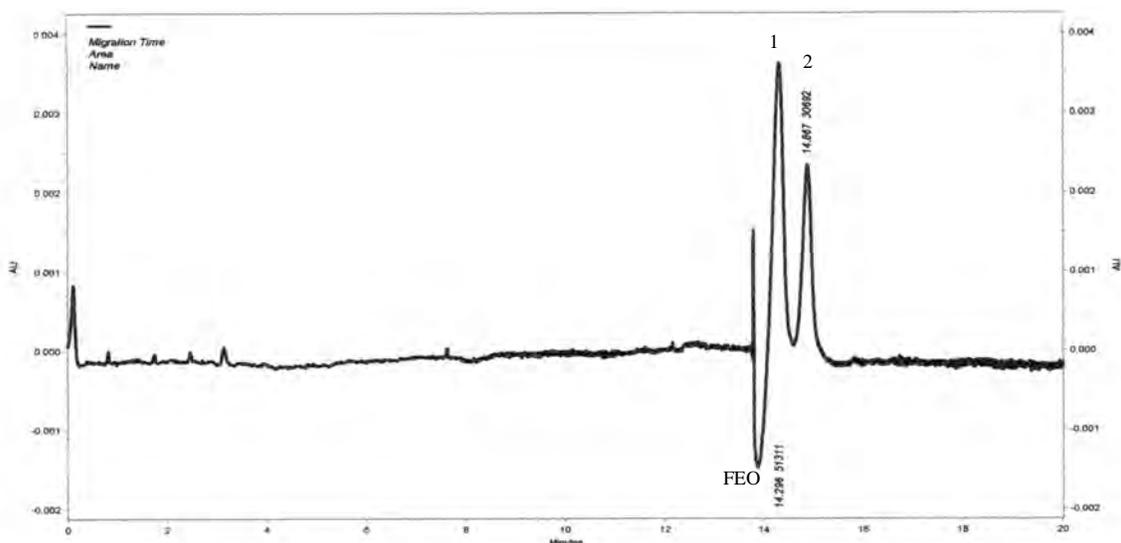


Figura 5.27. Análisis electroforético de mezclas de dIPPR y tIPPR en relación 1:2 en capilar de sílica fundida.

En la Figura 5.27. se observa el electroferograma de la separación de la primera mezcla analizada. La mezcla fue de 1:2 y se observó un incremento en contenido relativo del primer pico y un decremento del segundo. El cambio fue de 30% hasta 61.8%, y el decremento en el segundo pico fue de 70% hasta 38.2%. Considerando este resultado se puede definir la estructura que corresponde a cada uno de los picos. La dIPPR migra primero muy cerca del FEO (primer pico) y la tIPPR migra después de la dIPPR (segundo pico). Para corroborar esta información calculó la relación porcentual esperada de cada una de partículas en la mezcla, la cual fue de 61% dIPPR

y 39% tIPPR. Estos valores son muy cercanos al 61.8% de dIPPR y 38.2% de tIPPR obtenidos al determinar las áreas bajo la curva en el electroferograma.

Se realizó otra mezcla para corroborar esta información y asegurar la identidad de las estructuras en el análisis electroforético. En la Figura 5.28. se observa el análisis de la muestra cuya relación dIPPR:tIPPR fue de 1:1. Los porcentajes calculados de dIPPR y tIPPR en la muestra final fueron de 50% para cada estructura.

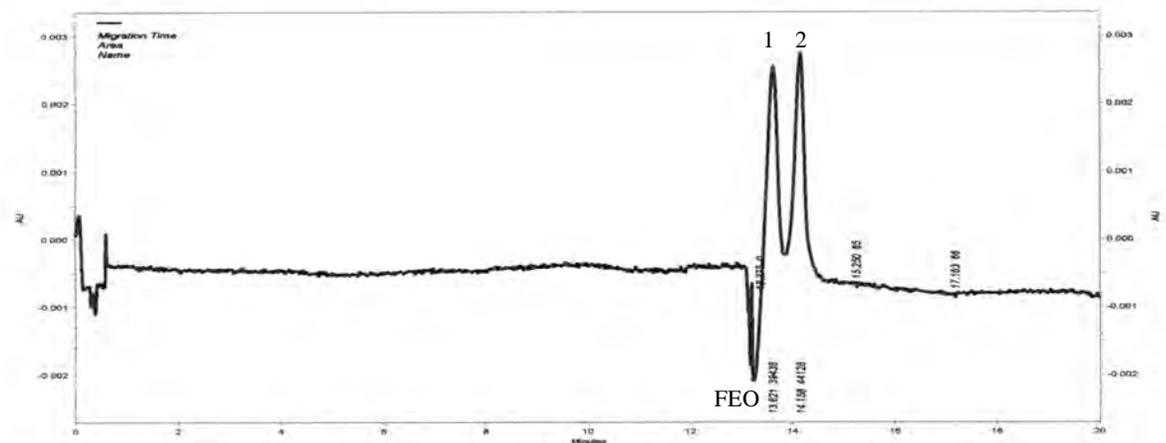


Figura 5.28. Análisis electroforético de mezclas de dIPPR y tIPPR en relación 1:1 en capilar de sílica fundida.

Los porcentajes obtenidos al hacer el análisis electroforético fueron de 49.8% del pico 1 (dIPPR) y 50.2% del pico 2 (tIPPR). Este segundo experimento es concluyente en vista de la reproducibilidad de las corridas electroforéticas y las movilidades electroforéticas de cada una de las PPR analizadas.

Los resultados obtenidos de estos análisis nos permiten diferenciar entre la dIPPR y la tIPPR. Dentro de la separación por electroforesis capilar existe un parámetro importante que nos indica la eficiencia en la separación de las diferentes muestras, el cual es el número de platos teóricos (Ver ecuación 10.5.6.). El número de platos teóricos calculado para la separación de tIPPR fue de 51,840 y para la dIPPR fue de 64,990. En el sistema de electroforesis capilar se pueden obtener números de platos teóricos con valores entre 10^5 y 10^6 y esto depende de la difusión de la muestra en el capilar, y principalmente aquellas interacciones de los analitos con el capilar. Estos valores de platos teóricos son superiores a los obtenidos en HPLC (Potier et al., 2001).

El reto posterior fue determinar si es posible cuantificar estructuras de dIPPR y tIPPR en muestras provenientes de cultivos. Se inyectaron al capilar muestras de cinéticas que fueron pre-purificadas en el HPLC (1 ml de muestra dividida en 10 inyecciones de 100 μ L) y concentradas hasta un volumen final de 30 μ L.

En la Figura 5.29. se observa el electroferograma de la muestra de cultivo infectado a las 96 h.p.i, en el cual no se observó ningún pico después del FEO, probablemente debido a una baja concentración de PPR en la muestra.

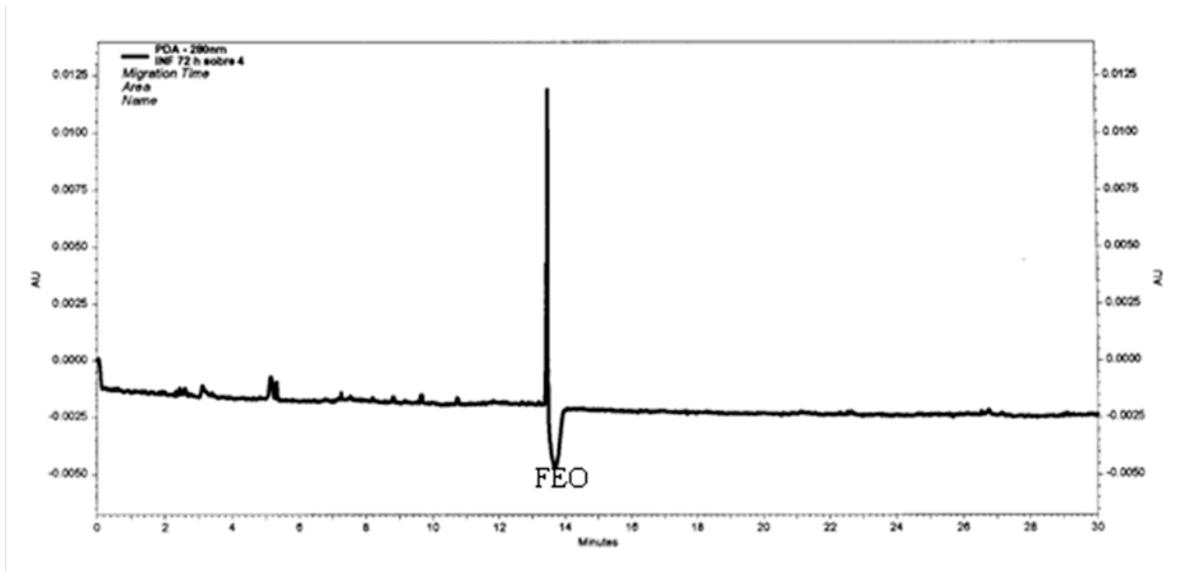


Figura 5.29. Electroferograma de una muestra de cultivo a las 96 h.p.i. purificada por HPLC.

También se analizó una muestra de cultivo concentrada (96 horas), sin pasarla antes por HPLC (Ver Figura 5.30.). La muestra del electroferograma mostrado en la Figura 5.30. tenía una concentración de proteína total de 1.5 mg/mL. Es posible observar en el electroferograma algunos picos que migran aproximadamente al tiempo de dIPPR y tIPPR. Para determinar si se trataba de PPR se realizó una mezcla de esta muestra con dIPPR y tIPPR purificadas (Fig. 5.31.).

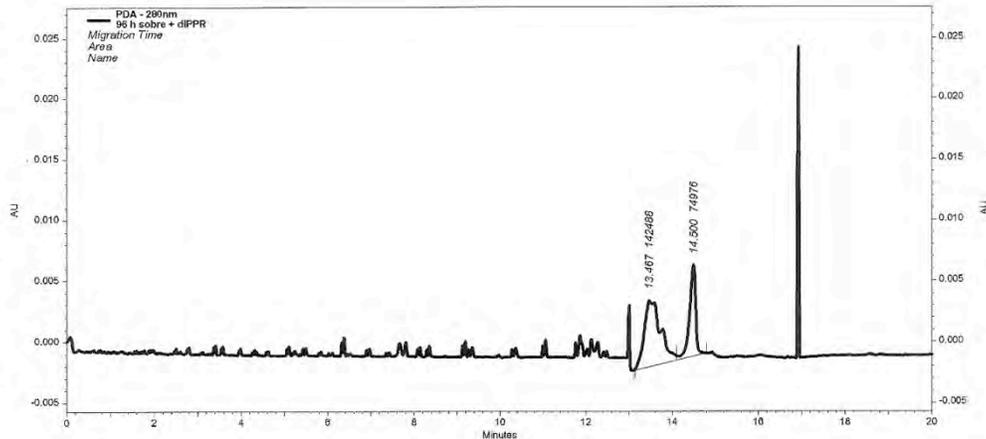


Figura 5.30. Electroferograma de una muestra concentrada de cultivo de las 96 h.p.i.

En la Figura 5.31.A. se observa la muestra a la cual se le adicionó dIPPR (mezcla 1:1). La diferencia del área bajo la curva en relación con el electroferograma de la muestra de cultivo, no es proporcional a la cantidad de PPR agregada, de acuerdo a los resultados anteriores. Esto indica que las proteínas que están presentes en el sobrenadante (posiblemente las proteínas virales, y baculovirus u otros componentes de cultivo) migran a tiempos muy similares a la dIPPR y tIPPR. En el electroferograma que se muestra en la Figura 5.31.B. se adicionó tIPPR observándose el mismo comportamiento que en la muestra con dIPPR (mezcla 1:1). Utilizando las metodologías propuestas en este trabajo fue imposible resolver los picos y cuantificar las PPR en muestras no puras.

Con el fin de evaluar otras alternativas se propuso un pretratamiento a la muestra, concentrando y prepurificando el sobrenadante de un cultivo infectado (10 mL concentrado 10 veces mediante el equipo de ultrafiltración AMICON utilizando una membrana de 30 kDa a través de una columna de 10 mL empacada con la resina HW65F. Se recolectaron las fracciones mostradas en la Figura 5.32. y se concentraron hasta un volumen final de 50 μ L (se cambió el buffer de elución a 10 mM Tris pH 7.4, 10 mM NaCl, 1 mM CaCl_2). Las fracciones fueron analizadas por ECZ (Fig. 5.33.). En las primeras dos fracciones esperábamos la presencia de la PPR. Sin embargo, no observamos pico alguno.

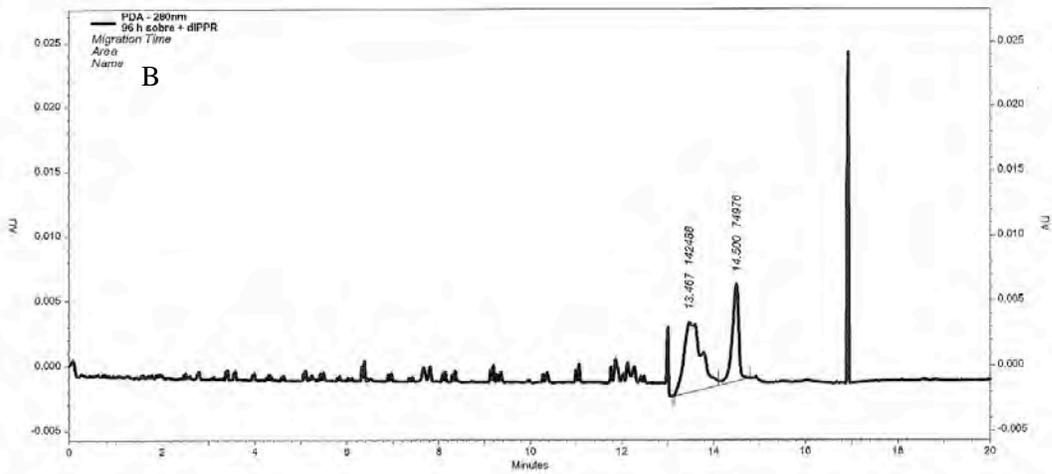
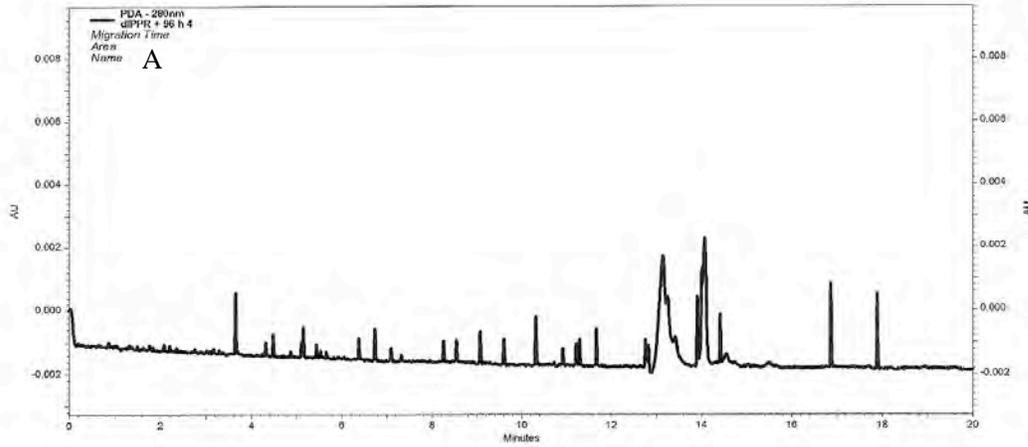


Figura 5.31. Electroferograma de muestras de cinética a las 96 h.p.i. concentrada añadiendo PPR a la muestra. A) dIPPR, B) tIPPR.

En la tercera fracción (Figura 5.33.C) se observan varios picos, indicando que había presentes una gran cantidad de proteínas. Algunas de las proteínas podrían ser las que interfieren con la identificación de las PPR en la muestra. Esto puede estar agravado por una baja concentración de PPR en la muestra.

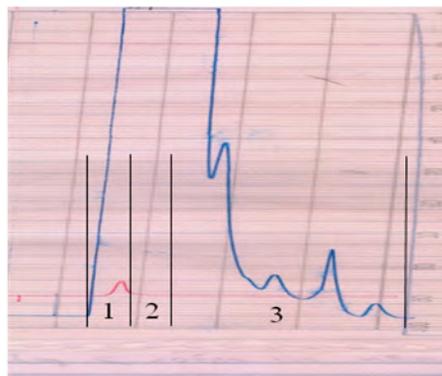


Figura 5.32. Cromatograma de la pre-purificación de tPPR por FPLC. Con números se indican las fracciones que se recolectaron. Se puede observar que la señal se saturó por lo que no se observan los picos de la recolección.

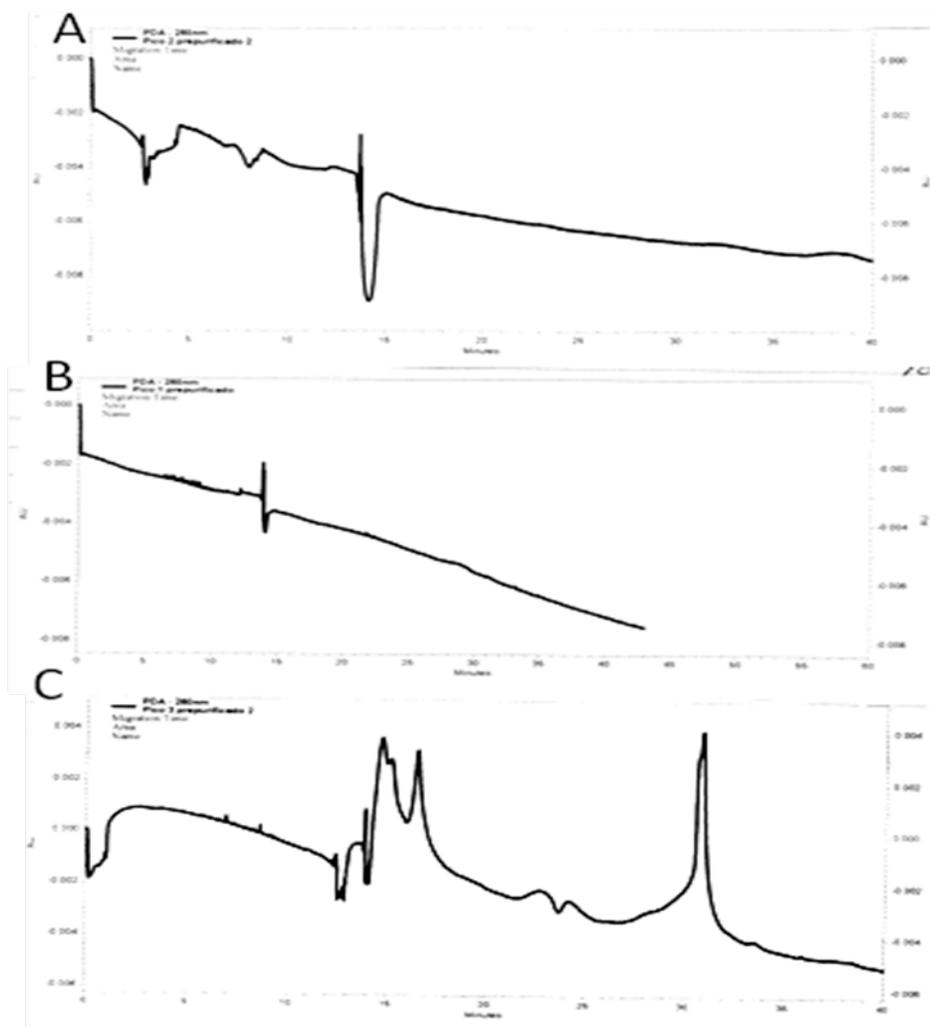


Figura 5.33. Electroferograma de muestras pre-purificadas de tPPR por FPLC. A) Primera parte elución de FPLC, B) segundo pico de elución y C) tercer pico elución.

Otra posible estrategia para cuantificar dIPPR y tIPPR en muestras de cultivo es concentrar mayor volumen de muestra (20-30 mL) y purificando en el HPLC con columnas de exclusión molecular las macroestructuras para su posterior análisis en EC.

5.4. EVALUACIÓN DEL MÉTODO DESARROLLADO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE tIPPR Y dIPPR

La evaluación de la metodología desarrollada para la cuantificación de dIPPR y tIPPR se realizó con base en la guía de la ICH (Internacional Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use) *Validation of analytical procedures: Text and methodology* Q2(R1). Los parámetros que se evaluaron son los siguientes:

1. Especificidad
2. Generación de una curva estándar y linealidad del sistema
3. Paralelismo
4. Precisión y exactitud
5. Reproducibilidad
6. Límite de detección y cuantificación

5.4.1. ESPECIFICIDAD

Para demostrar especificidad se debe demostrar que lo que se está analizando es realmente el análisis de interés. Esto quedó determinado utilizando varios análisis: microscopía electrónica, HPLC de exclusión en gel, geles de poliacrilamida y Western blot, en donde se demuestra la presencia de las PPR así como su identidad (Ver Figuras 5.10 , 5.11, 5.13, 5.14, 5.22, 5.23 y 5.24).

5.4.2. GENERACIÓN DE UNA CURVA ESTÁNDAR Y LINEARIDAD DEL SISTEMA

Se realizaron las curvas estándar para la cuantificación de la dIPPR y tIPPR. Para que la curva generada pueda considerarse lineal el coeficiente R^2 debe ser cercano a 1. Para la curva estándar de la tIPPR, se realizaron inyecciones por triplicado de muestras con diferentes concentraciones,

como se muestra en la tabla 5.1. Las diluciones para la muestra de tIPPR se realizaron adicionando una solución TNC.

Tabla 5.1. Área bajo la curva del pico correspondiente a tIPPR a diferentes concentraciones

tIRLP ($\mu\text{g/mL}$)	Area ($\text{UA} \cdot \text{min}$)	D.E.
88	65523	1879
44.0	31705	1769
32.5	23694	1457
22.0	15879	1688
13.0	9705	507
6.5	5470	296

(D.E., desviación estándar)

Con base en los resultados reportados en la tabla 5.1 se realizó la curva estándar que se observa en la figura 5.34.

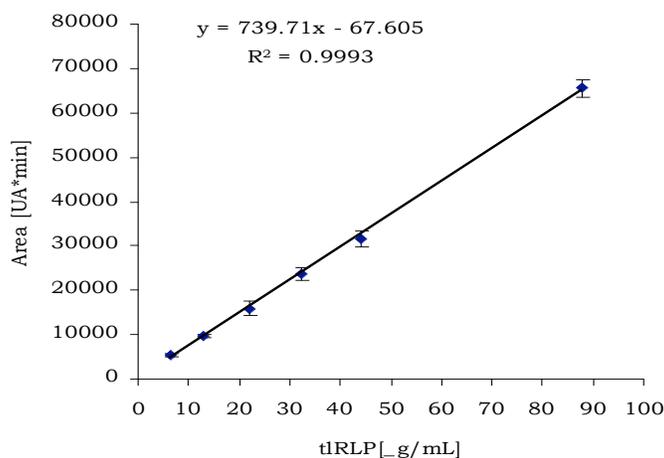


Figura 5.34. Curva estándar de tIPPR en CZE.

Con base en la gráfica que se muestra en la figura 5.34. y la regresión lineal de los puntos obtenidos graficando la concentración de tIPPR ($\mu\text{g/mL}$) vs área ($\text{UA} \cdot \text{min}$), se obtuvo la ecuación correspondiente para determinar la concentración de tIPPR en muestras problema.

$$[\mu\text{g/mL}]_{\text{tIPPR}} = (\text{Abs}_{280\text{nm}} + 67.605) / 739.71$$

Se realizó también este análisis para la dlPPR. Los resultados se pueden observar en la tabla 5.2. y la curva estándar en la figura 5.35. Las diluciones para la muestra de dlPPR se realizaron adicionando una solución 10 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8.

Tabla 5.2. Área bajo la curva del pico correspondiente a dlPPR a diferentes concentraciones.

dlRPLP $\mu\text{g/mL}$	Area [UA*min]	D.E.
100	89655	1381
40	32493	1115
20	16580	290
19	13396	301
10	7980	713
9.5	7305	422
5.7	4338	176
2.85	2870	42

(D.E., desviación estándar)

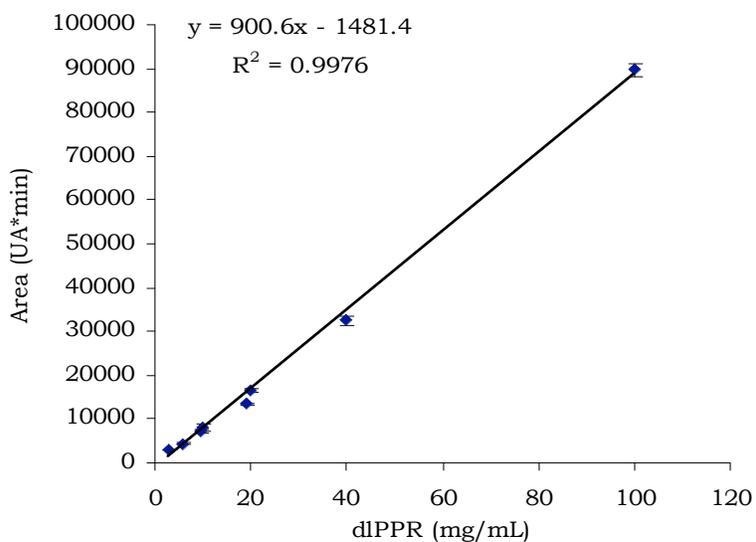


Figura 5.35. Curva estándar de dlPPR en CZE.

Con base en la gráfica que se muestra en la Figura 5.35. y la regresión lineal de los puntos obtenidos graficando la concentración de dlPPR ($\mu\text{g/mL}$) vs área (UA*min), se obtuvo la ecuación correspondiente para determinar la concentración de dlPPR de muestras problemas.

$$[\mu\text{g/mL}]_{\text{dlPPR}} = (\text{Abs}_{280\text{nm}} + 1481.4)/900.6$$

Se obtuvieron los coeficientes de correlación R y R^2 para cada una de las dos curvas estándar. Para la tIPPR estos fueron de 0.9997 y 0.993 respectivamente y la ordenada al origen de 67.605. En lo que corresponde a la dIPPR, los coeficientes de correlación R y R^2 fueron de 0.9988 y 0.9976 respectivamente, y la ordenada al origen de 1481. Como se puede observar en ambos casos se cumplen el criterio para considerar que la curva estándar generada en este sistema es lineal.

5.4.3. PARALELISMO

La prueba de paralelismo consiste en determinar que es posible analizar muestras problemas para demostrar que no existe interferencia con la determinación de los analitos de interés. También, en este análisis lo que se busca es determinar que bajo las mismas condiciones de separación se pueden analizar varias muestras de PPR en las cuales determinar la relación dIPPR y tIPPR. Para determinar el paralelismo se analizaron muestras en las que la relación dIPPR/tIPPR no era conocida. En la Figura 5.36. se puede observar el electroferograma de la muestra que se rotuló como tIPPR pellet.

En esta muestra la relación porcentual entre dIPPR/tIPPR fue de 26/74 %. El t_m de la tIPPR fue de 15.090 ± 0.046 min, lo que corresponde a una μ_{ef} de 2.75 ± 0.02 Ti y se determinó una absorbancia de $27,843 \pm 1184$ UA. Para la dIPPR que estaba presente en el cultivo, el t_m fue de 14.420 ± 0.037 min, lo que corresponde a una μ_{ef} de 1.20 ± 0.02 Ti y se determinó una absorbancia de $13,456 \pm 2674$ UA.

Las μ_{ef} obtenidas fueron similares a las ya calculadas para la tIPPR y dIPPR, además se analizó la presencia de las PPR mediante HPLC, Western blot y SDS-PAGE, para confirmar el resultado. Es posible diferenciar las PPR las cuales han sido purificadas previamente pero como se observó en las Figuras 5.26., 5.27. y 5.28. no es posible hacerlo de muestras que no han sido previamente tratadas, por lo que el punto de paralelismo no se cumple para muestras no purificadas.

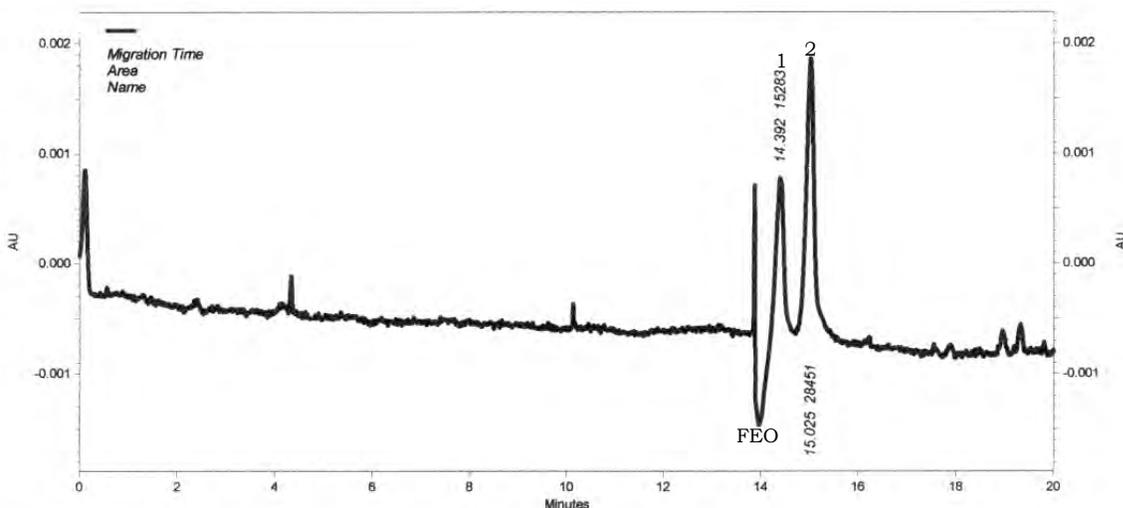


Figura 5.36. Análisis de tIPPR pellet por ECZ.

5.4.4. PRECISIÓN Y EXACTITUD

Para que la metodología sea precisa y exacta se deben realizar diferentes inyecciones de muestras al equipo en un día de trabajo y en diferentes días y determinar la precisión y exactitud mediante análisis estadístico. Para determinar la precisión del sistema se realizaron diversas inyecciones de las muestras de tIPPR (88 $\mu\text{g/mL}$) y de dIPPR (100 $\mu\text{g/mL}$). La separación se realizó bajo las mismas condiciones anteriormente mencionadas. Para determinar las diferencias en los tiempos de migración y áreas bajo la curva de absorbancia de los dos picos característicos de la muestra de tIPPR y el pico característico de la muestra de dIPPR, se realizaron varias inyecciones al equipo ($n=7$). Con estos datos, se realizó también el análisis de precisión del método entre diferentes días de análisis. En la Tabla 5.3. se pueden observar los tiempos de migración, las áreas bajo la curva (unidades de absorbancia*min) y la μ_{ef} , de las muestras analizadas en un mismo día.

Como se observa en la tabla 5.3., el t_m de la dIPPR en la muestra fue de 14.6 ± 0.042 min, una absorbancia de 24646 ± 1692 UA y una μ_{ef} de 1.256 ± 0.017 Ti. En lo que corresponde a la tIPPR el t_m fue de 15.2 ± 0.042 min, una absorbancia de 65523 ± 1879 y una μ_{ef} de 2.969 ± 0.022 Ti. El coeficiente de variación en la cuantificación de tIPPR fue de 2.2% y en la dIPPR de 1.8%

Tabla 5.3. Análisis de la precisión de la metodología al analizar la muestra de tIPPR. n=7

Día 1				
	Inyección	tm (min)	Area (UA*min)	μ_{ef} (Ti)
dIPPR	1	14.563	24825	1.27
	2	14.646	22872	1.26
	3	14.608	26242	1.24
tIPPR	1	15.204	66628	2.98
	2	15.288	66587	2.98
	3	15.246	63353	2.94

El análisis de la muestra en diferentes días, se muestra en la Tabla 5.4.

Tabla 5.4. Análisis de la precisión de la metodología en diferentes días de análisis para la muestra de tIPPR. n=7

		Día 1	D.E.Día 1	Día 2	D.E. Día 2	Día 3	D.E. Día 3
dIPPR	tm (min)	14.61	0.042	13.77	0.065	14.20	0.059
	Area (UA*min)	24646	1692	21831	520	26153	655
	μ_{ef} (Ti)	1.256	0.017	1.277	0.023	1.283	0.054
tIPPR	tm (min)	15.25	0.042	14.33	0.071	14.81	0.074
	Area (UA*min)	65523	1879	63127	832	63218	40
	μ_{ef} (Ti)	2.969	0.022	2.770	0.038	2.904	0.016

Con los datos reportados en la Tabla 5.4. se determinó la variación que existe al analizar las muestras en diferentes días. Se observó que existe una mayor variación en los tm, siendo la desviación estándar (D.E.) de los tm de 0.419 min para la dIPPR y de 0.461 para la tIPPR. En cuanto la absorbancia, la D.E. fue de 2144 UA para la dIPPR y de 1358 UA para la tIPPR. La variación en la μ_{ef} fue de 0.014 Ti para dIPPR y 0.046 Ti para la tIPPR. La variación en los tiempos de migración en los capilares de sílica fundida ya ha sido reportada en diversos reportes, en los cuales se hace mención a que el problema puede solucionarse mediante la adición de estándares, principalmente un marcador de FEO (Jumppanen y Riekkola, 1995). Cabe recalcar que bajo las condiciones de separación, las soluciones utilizadas y las características de las muestras analizadas de esta tesis, se logró determinar el FEO en cada una de las corridas electroforéticas, lo que minimiza *per se* la variación obtenida en los tm debido a que se puede calcular la μ_{ef} .

Con los datos obtenidos en el análisis, se determinaron los diferentes parámetros para determinar la precisión del sistema en la cuantificación de la tIPPR, tomando en cuenta un número de inyecciones de 7:

1. Concentración experimental promedio: 86.85 $\mu\text{g/mL}$
2. Desviación estándar: 2.29
3. Coeficiente de variación: 2.63%
4. Concentración máxima: 90.2 $\mu\text{g/mL}$
5. Concentración mínima: 84.6 $\mu\text{g/mL}$
6. Intervalo de confianza $\pm 1.07 \mu\text{g/mL}$
7. t student: 1.32, con este valor de t student y su comparación en tablas se concluye que el método es exacto
8. El método es preciso con una certeza del 97%

En lo que corresponde a la dIPPR, en la tabla 5.5. se muestran los resultados obtenidos para el análisis de la muestra en un día.

Tabla 5.5. Análisis de la precisión de la metodología al analizar la muestra de dIPPR.

		Día 1		
	Inyección	tm (min)	Area (UA*min)	μ_{ef} (Ti)
dIPPR	1	14.575	90932	1.25
	2	14.379	89845	1.27
	3	14.5	88189	1.23

Se determinaron los tm para la muestra de dIPPR, los cuales fueron de $14.48 \pm .098$ min, una absorbancia de 89655 ± 1375 UA y una μ_{ef} de 1.25 ± 0.02 Ti. Se realizó también el análisis entre los diferentes días, los cuales se muestran en la tabla 5.6. El coeficiente de variación fue de 1.2%.

Tabla 5.6. Análisis de la precisión de la metodología en diferentes días de análisis para la muestra de dIPPR.

		Día 1	D.E. Día 1	Día 2	D.E. Día 2	Día 3	D.E. Día 3
dIPPR	tm (min)	14.5	0.099	14.3	0.024	13.8	0.034
	Area (UA*min)	89655	1381	88271	1564	88762	1452
	μ_{ef} (Ti)	1.25	0.020	1.27	0.030	1.27	0.021

Con los datos reportados en la tabla 5.6., se determinó la variación que existe al analizar las muestras en diferentes días. Se observó que al igual que en el análisis de la tIPPR en diferentes días, existe una mayor variación en los t_m de la muestra inyectada de dIPPR, siendo la D.E. de 0.354 min. La D.E. del área bajo la curva del pico de dIPPR fue de 701 UA y la μ_{ef} , de 0.032 Ti. Los coeficientes de variación de los t_m fueron de 0.27% y 0.28% en las muestras de dIPPR y tIPPR, respectivamente, y de las μ_{ef} de 1.3% y 1.4%, respectivamente.

Con los datos obtenidos en el análisis se determinaron los diferentes parámetros para determinar la precisión del sistema en la cuantificación de dIPPR, tomando un número de inyecciones de 7:

1. Concentración experimental promedio: 100.2 $\mu\text{g/mL}$
2. Desviación estándar: 1.41
3. Coeficiente de variación: 1.41%
4. Concentración máxima: 102.6 $\mu\text{g/mL}$
5. Concentración mínima: 98.6 $\mu\text{g/mL}$
6. Intervalo de confianza $\pm 0.19 \mu\text{g/mL}$
7. t student: 0.37, con este valor de t student y su comparación en tablas se concluye que el método es exacto
8. El método es preciso en un 99.8%

Con base en los resultados obtenidos, se puede concluir el método es preciso y exacto para la cuantificación de dIPPR y tIPPR.

5.4.5. REPRODUCIBILIDAD

Determinar la reproducibilidad mediante el cálculo del factor F consiste en determinar que las desviaciones estándares obtenidas en los diferentes análisis electrofóreticos de la muestra inyectada sean iguales, lo que permite determinar si un conjunto de datos obtenido es diferente entre si o no. Se analizaron diferentes muestras de los estándares y se calculó la F experimental, la cual se obtiene de la siguiente expresión:

$$F = \frac{(N(Y_{\text{prom}} - \mu_o)^2) / (\sum(Y_{\text{prom}} - Y_i)^2)}{(N-1)}$$

Donde N es el número total de determinaciones, \bar{Y} es la media de los resultados obtenidos, μ_0 es la media teórica, Y_i son los valores individuales de los resultados obtenidos para cada uno de los análisis.

El valor experimental de F para el análisis de la muestra de tIPPR fue de 0.048 y para la dIPPR de 0.005. Analizando estos valores en tablas, se determinó que el método es reproducible con un 98 % de certeza en ambos casos ya que sus desviaciones estándares no son significativamente diferentes.

5.4.6. LÍMITE DE DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN

Existen fórmulas para determinar el límite de cuantificación y de detección de un método. Estas consideran que el límite de detección es 3 veces la desviación estándar del valor del blanco y el límite de cuantificación es 10 veces el mismo valor. De esta forma se determinaron los límites de detección y cuantificación, y además, se analizaron diferentes diluciones para determinar la validez de este cálculo.

Los límites de detección y cuantificación para la tIPPR calculados fueron de 1.41 y 4.10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. En lo que respecta a la dIPPR, estos fueron de 1.80 y 2.11 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Para corroborar esta información se analizaron diluciones de la muestra de tIPPR en las que las concentraciones de tIPPR fueron de 6.50 $\mu\text{g/mL}$, 4.4 $\mu\text{g/mL}$ y 2.6 $\mu\text{g/mL}$, y de dIPPR de 2.94 $\mu\text{g/mL}$, 1.9 $\mu\text{g/mL}$ y 1.14 $\mu\text{g/mL}$. En la Figura 5.37. se observan los electroferogramas de dichas muestras. En la muestra que se observa en la Figura 5.37., la concentración de tIPPR fue de 6.50 $\mu\text{g/mL}$ y 2.94 $\mu\text{g/mL}$ de dIPPR. Las áreas bajo la curva pudieron integrarse de una manera adecuada, siendo estas de 5740 ± 295 UA. (7.85 ± 0.49 $\mu\text{g/mL}$) de tIPPR y 2870 ± 41 UA. (4.73 ± 1.69 $\mu\text{g/mL}$). En la Figura 5.37.B. se puede observar la muestra cuya concentración de tIPPR fue de 4.4 $\mu\text{g/mL}$ y 1.9 $\mu\text{g/mL}$ de dIPPR. Se puede observar que los picos de ambas estructuras son detectables y se logró determinar el área de ambas, las cuales fueron de 2257 ± 427 UA. (3.14 ± 0.668 $\mu\text{g/mL}$) para la tIPPR y 1285 ± 4.5 UA. (3.07 ± 1.64 $\mu\text{g/mL}$) para la dIPPR. Por último en la Figura 5.37.C. se observa el electroferograma de la muestra cuya concentración de tIPPR fue de 2.6 $\mu\text{g/mL}$ y 1.14 $\mu\text{g/mL}$ de dIPPR. En este caso las áreas bajo la curva sí lograron determinarse, pero la D.E. fue mayor al valor promedio de la absorbancia.

Con base en el área (UA*min) de cada uno de los picos, se pueden determinar estos límites experimentalmente. El límite de detección experimental de tIPPR fue cercano a 2.6 µg/mL, ya que como se observa en la Figura 5.37.C. es aun viable determinar la presencia de la tIPPR y además, es cercano al dato obtenido de 1.41 µg/mL aplicando la fórmula del límite de detección. En cuanto al límite de cuantificación, esta por arriba de 4.0 µg/mL (considerando la D.E. de los valores de áreas bajo la curva obtenidos en el electroferograma de la figura 5.37.), el cual es similar al obtenido con la fórmula del límite de cuantificación, 4.10 µg/mL. En lo que corresponde a la dIPPR, los límites de detección y cuantificación pueden fijarse conforme a los resultados experimentales. El límite de detección sería de 1.14 µg/mL para el límite de detección y de 2 µg/mL el límite de cuantificación (esto considerando la D.E. de las inyecciones analizadas). Estos datos están cercanos también a los calculados con las fórmulas del límite de detección y cuantificación calculados.

Con la metodología desarrollada en esta tesis fuimos capaces de separar la dIPPR y tIPPR, además de realizar curvas estándar para determinar la concentración de muestras problemáticas, lo que hasta este momento no se había logrado. Como se había comentado, anteriormente la concentración de PPR se calculaba utilizando inmunodetección, lo que probablemente sobrevaluaban la concentración de las PPR (Vieira et al., 2005; Roldao et al., 2007). Dentro de la evaluación del método desarrollado, se cumplieron con los diferentes parámetros requeridos a excepción del paralelismo, pero por el momento es el primer método dentro de nuestro conocimiento que utiliza EC para cuantificar PPR con base en la proteína total de cápside. Existe reportado un trabajo por Shambaugh y colaboradores (2004), en el que determinan la concentración de rotavirus nativo analizando la concentración de RNA en las muestras, lo que no es posible aplicar para el cálculo de PPR ya que estas no contienen material genético. Además se han reportado diferentes trabajos en la literatura en los que se analizan cápsides virales, esto de una manera cualitativa y siempre con la finalidad de discernir entre intermediarios, partículas no ensambladas y otros contaminantes (Kremser et al., 2006; Kremser et al., 2007; Schnabel et al., 1996; Okun et al., 1999; Okun et al., 2000). Gracias a este trabajo será posible en un futuro conocer la composición de preparaciones de PPR.

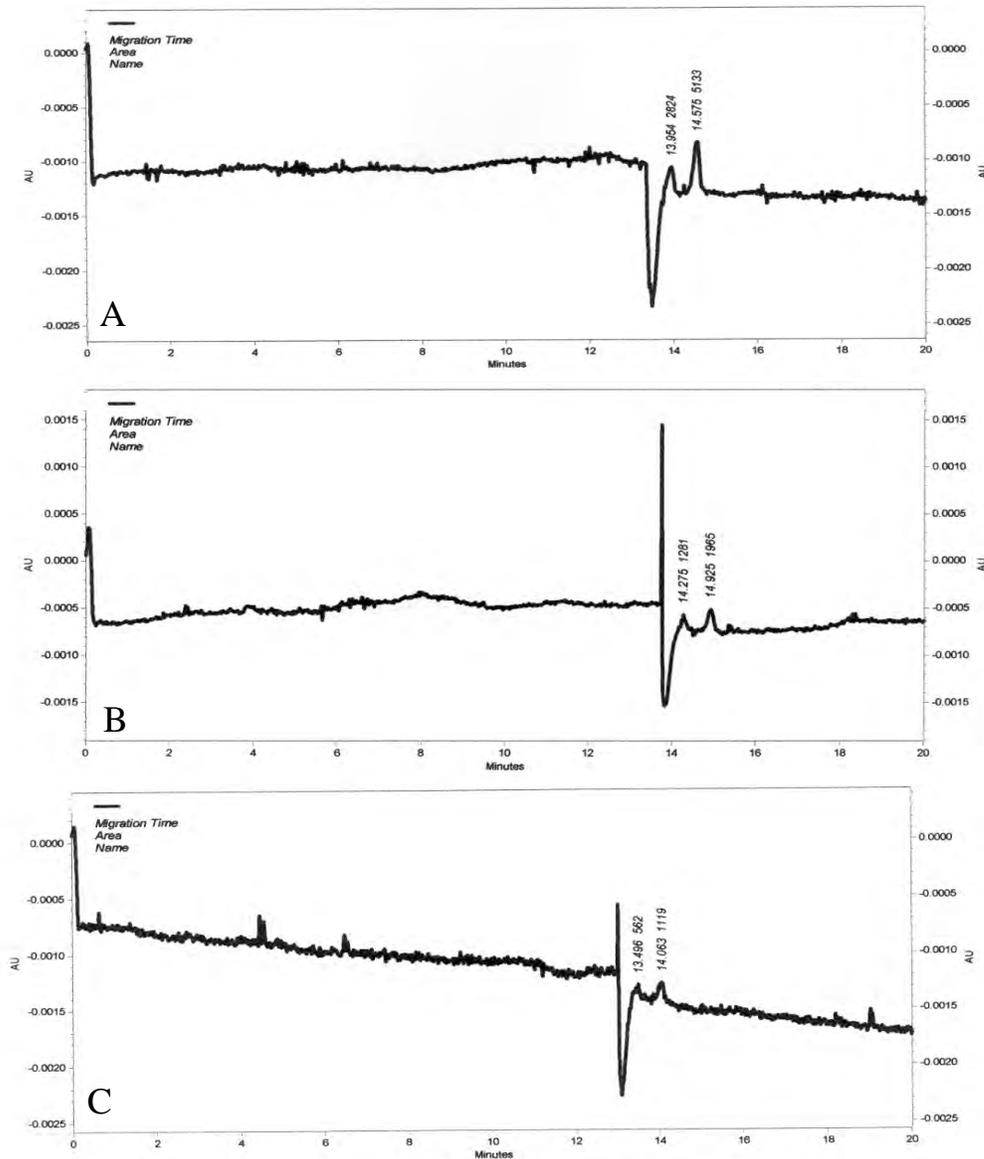


Figura 5.37. Electroferogramas de diluciones de muestras de tIPPR y dIPPR. A) 6.50 $\mu\text{g/mL}$ tIPPR y 2.94 $\mu\text{g/mL}$ dIPPR, B) 4.4 $\mu\text{g/mL}$ tIPPR y 1.9 $\mu\text{g/mL}$ dIPPR, C) 2.6 $\mu\text{g/mL}$ tIPPR y 1.14 $\mu\text{g/mL}$ dIPPR.

5.5. CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN DE tIPPR Y dIPPR

5.5.1. CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS HIGH FIVE[®]

Se realizaron cinéticas de crecimiento de la línea celular High Five[®] con la finalidad de tener controles negativos. Además, conocer el comportamiento de la línea celular permitió determinar el momento y densidad celular adecuados para realizar la infección. Los parámetros que se

analizaron durante el cultivo fueron la concentración celular total (X_t) y la viabilidad celular. En la Figura 5.38. se muestra una cinética típica de crecimiento de células High Five[®].

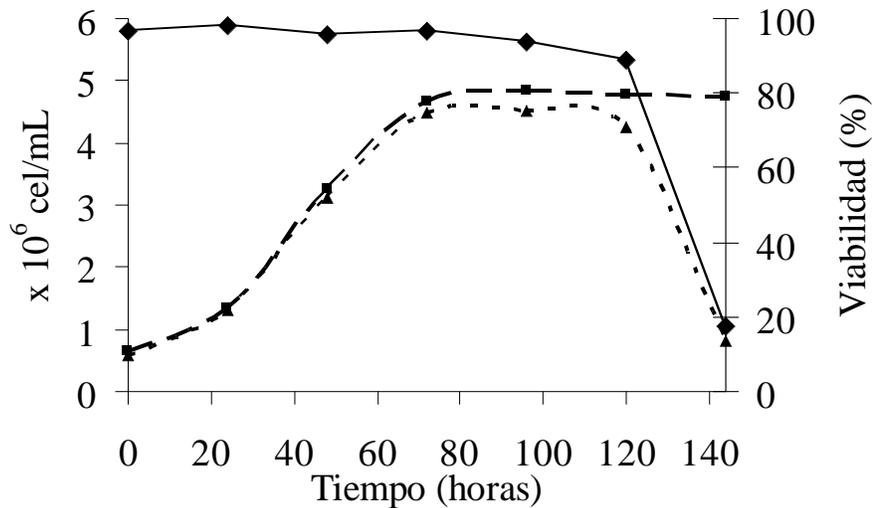


Figura 5.38. Cinética de crecimiento de células High Five[®] sin infectar. Viabilidad celular (♦), concentración celular total (X_t) (■) y concentración de células viables (X_v) (▲).

Se inoculó el matraz a una densidad celular de 0.5×10^6 cél/mL. La máxima concentración celular alcanzada fue de 4.6×10^6 cél/mL. La viabilidad fue mayor al 95% hasta las 120 horas. Después de las 120 horas, el cultivo entró en fase de muerte y la viabilidad celular bajo hasta el 20% a las 144 horas. La velocidad específica de crecimiento (μ) fue de 0.034 h^{-1} , que es similar a la reportada de 0.037 h^{-1} (Mena, 2004).

5.5.2. CINÉTICAS DE PRODUCCIÓN EN COINFECCIONES CON 3 BACULOVIRUS (bacEGFPVP2, bacVP6 Y bac VP7)

Se infectaron células H5 a una MDI de 1 ufp/cel para cada baculovirus (bacEGFPVP2, bacVP6 y bacVP7). Las infecciones se realizaron a una densidad celular de 0.5 y 1×10^6 cel/mL, cuando los cultivos se encontraban en su fase de crecimiento exponencial. Se tomaron muestras cada 24 horas analizando viabilidad y X_t (Ver Figura 5.39.). Las muestras provenientes de sobrenadante, pellet lisado (sobrenadante obtenido después de la lisis celular) y pellet retenido (los fragmentos celulares insolubles después de la lisis celular) se analizaron para conocer la concentración de EGFPVP2 producida a los diferentes tiempos de cultivo y así extrapolarlo a concentración de

PPR. Debe tomarse en cuenta que la coinfección con 3 baculovirus resulta en la producción de sIPPR, dIPPR y tIPPR. Como se explicó anteriormente no fue posible diferenciar entre dIPPR y tIPPR de muestras de cultivo. Por claridad en este trabajo se referirá como PPR a la suma de dIPPR y tIPPR.

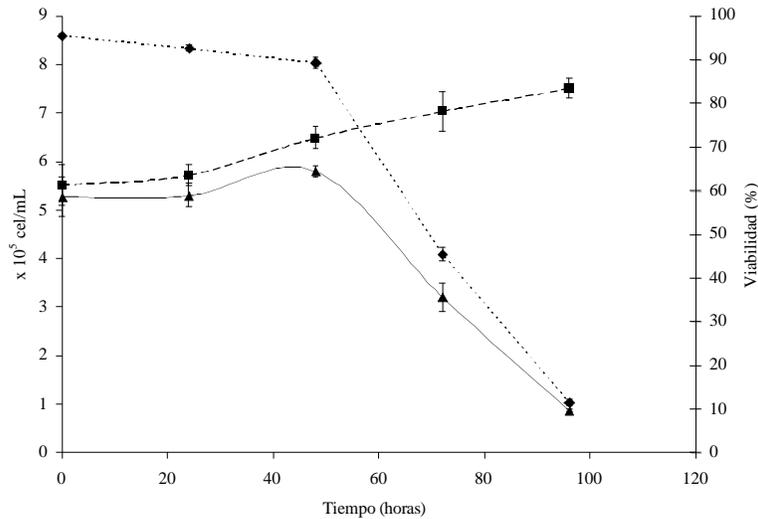


Figura 5.39. Cinética de crecimiento de un cultivo coinfectado con 3 baculovirus, bacEGFPVP2, bacVP6 y bacVP7. Viabilidad celular (♦), Xt (■) y Xv (▲).

El experimento se detuvo a las 96 horas, cuando la viabilidad celular decayó por debajo del 20%. Las muestras de pellet y sobrenadante se analizaron por Western blot (Fig. 5.40.), con la finalidad de determinar la expresión de las proteínas virales en el cultivo y determinar la relación de su producción por densitometría. De esta forma, sería posible estimar la relación entre dIPPR y tIPPR en la muestra. La proteína VP7 fue la que se produjo mayoritariamente. El análisis por densitometría (Image, NIH) arrojó una relación VP7/VP6 en el sobrenadante de 29 a las 72 y 96 horas post-infección, mientras que en pellet esta relación fue menor (10). La relación másica entre VP7/VP6 en la cápside viral es de 0.89. Por lo tanto, dentro y fuera de la célula hay un exceso de VP7 para la formación de tIPPR. Estudios realizados por Vieira y colaboradores (2005) proponen que la producción de tIPPR en el cultivo depende de contar con altas concentraciones de VP7.

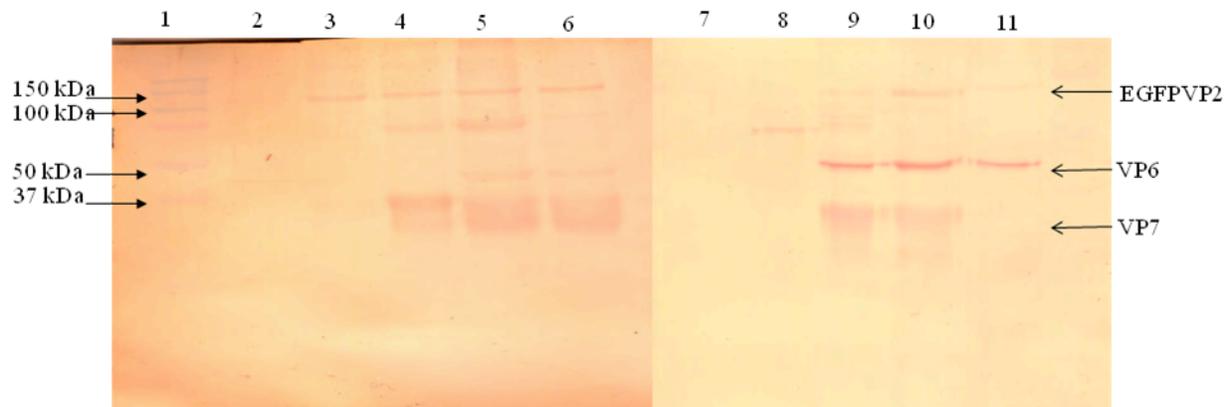


Figura 5.40. Western blot de sobrenadante y pellet lisado de infecciones. 1) Marcador de peso molecular Dual color, 2) 0 horas sobrenadante, 3) 24 horas sobrenadante, 4) 48 horas sobrenadante, 5) 72 horas sobrenadante, 6) 96 horas sobrenadante, 7) 0 horas pellet, 8) 24 horas pellet, 9) 48 horas pellet, 10) 72 horas pellet y 11) 96 horas pelle. Se utilizó el anticuerpo anti-rotavirus YM (1:2000).

Con la finalidad de determinar las concentraciones de EGFPVP2 que se encuentran en las diferentes fases de cultivo, las muestras se analizaron por HPLC y espectrofluorímetro como se describe en Materiales y Métodos. En la Figura 5.41. se muestran los cromatogramas de HPLC de exclusión en gel obtenidos del análisis de los sobrenadantes de cultivo a los diferentes h.p.i. En la Figura 5.41.A. se muestra el cromatograma de los sobrenadantes del cultivo infectado, donde aparece el pico que corresponde a las PPR alrededor de los 15 minutos. También se observa un pico alrededor de los 22 minutos, que es el tiempo característico de elusión de EGFP, lo que indica que existe degradación de EGFPVP2. Se puede observar otro pico (pico 3) que eluye alrededor de los 24 minutos, el cual se debe a fluorescencia intrínseca del medio de cultivo, ya que este también se observa en el tiempo 0 y no cambia a los diferentes tiempos de cultivo. En la Figura 5.41.B. se muestra el análisis de los pellet lisados, y en los que también se observa la degradación de EGFPVP2. Se analizaron las áreas bajo la curva de la intensidad de fluorescencia para determinar la concentración de EGFPVP2, así como de PPR en el cultivo (utilizando los factores másicos listados en Materiales y Métodos). A partir del contenido de EGFPVP2 en las PPR, es posible estimar la concentración de multímeros, pero no diferenciar entre dIPPR y tIPPR. Para diferenciar entre ambas PPR, se recolectó el pico correspondiente a las PPR, y se concentró para su análisis por Western blot. Sin embargo, no fue posible detectar las proteínas de rotavirus, posiblemente por su baja concentración o alto contenido de sales (datos no mostrados). La Figura 5.42. muestra la cinética de producción de EGFPVP2. Se observa la máxima concentración a las 48 h.p.i., y una posterior disminución de fluorescencia acompañada por un

aumento en la EGFPVP2 degradada. La degradación de EGFPVP2 en EGFP ya había sido reportada por Mena y colaboradores (2005) y Mena (2007), y propusieron que solamente existe proteólisis en la EGFPVP2 que no ha sido ensamblada en nucleocápsides o en PPR, ya que los poros presentes en la cápside no dejarían pasar las proteasas presentes en el cultivo. La concentración máxima de EGFPVP2 producida a lo largo del cultivo fue de 13.03 nmol/mL (1.56 $\mu\text{g/mL}$) de los cuales 8.91 nmol/mL (1.06 $\mu\text{g/mL}$) se encuentra en el pellet retenido, 1.43 nmol/mL (0.17 $\mu\text{g/mL}$) fue degradada a EGFP y VP2 y solamente 2.69 nmol/mL (0.32 $\mu\text{g/mL}$) se ensambla en PPR (Fig. 5.43.).

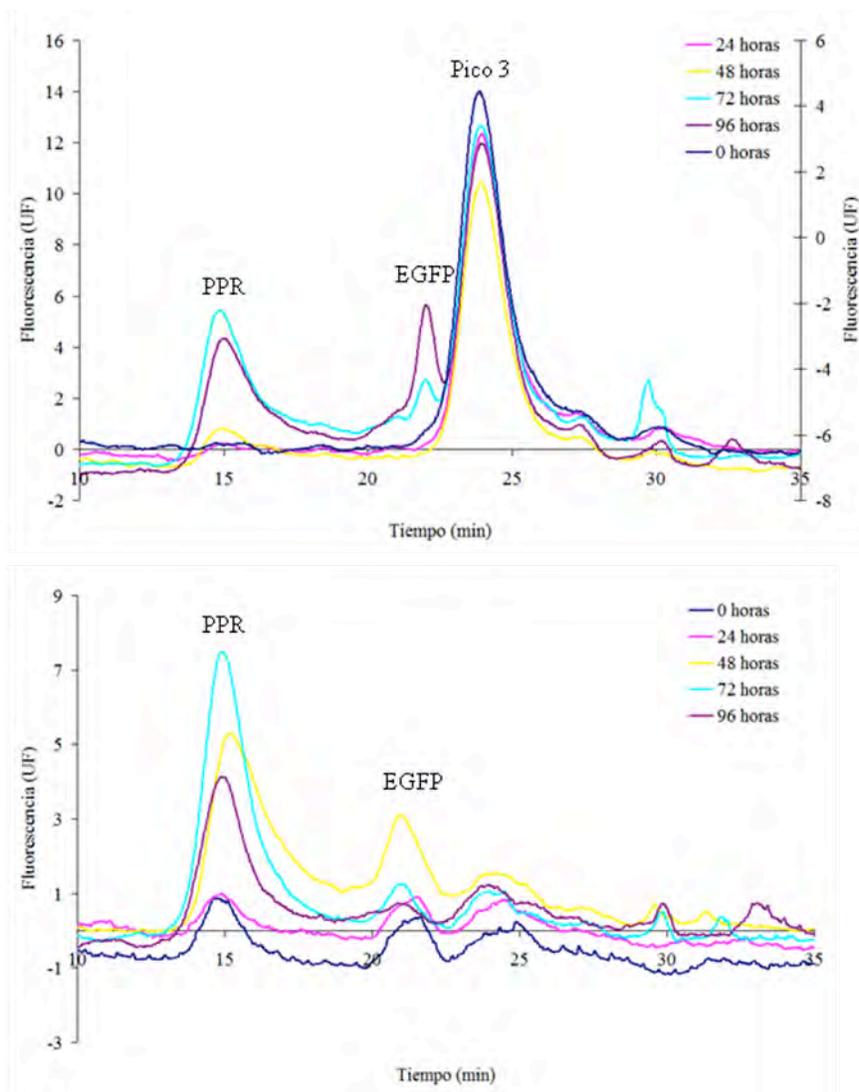


Figura 5.41. Análisis por HPLC de muestras de cultivo en la producción de tPPR. A) Sobrenadante, B) Pellet lisado.

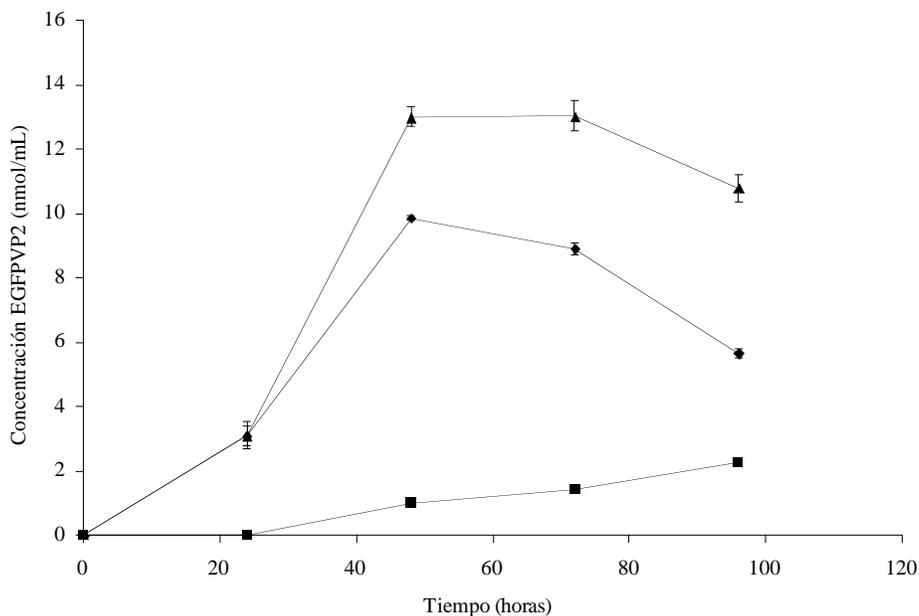


Figura 5.42. EGFPVP2 en diferentes fracciones de cultivo en la coinfección con 3 baculovirus. EGFPVP2 total (▲), EGFPVP2 en pellet retenido (◆) y EGFPVP2 degradada (■).

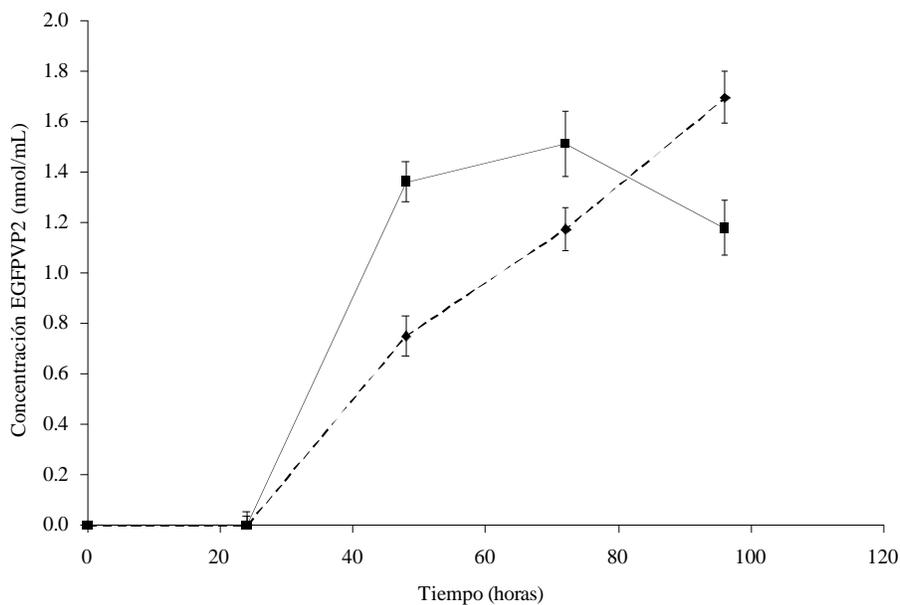


Figura 5.43. EGFPVP2 en sobrenadante y pellet lisado en la coinfección con 3 baculovirus. Sobrenadante (◆) y pellet lisado (■).

Se determinó la concentración de PPR en el cultivo mediante la relación de EGFPVP2 presente (tomando en cuenta la relación PPR/EGFPVP2). Se calculó la concentración molar de PPR considerando un ensamblaje 100% eficiente de EGFPVP2 en sobrenadante y pellet lisado (Fig. 5.44). La fracción de PPR en pellet fue del 40% mientras que la del sobrenadante fue del 60%.

Se conoce que la dIPPR se encuentra principalmente en el pellet (Mena, 2007), lo que podría indicar que la diferencia entre los cultivos se deba a la presencia de tIPPR. Al final del cultivo se obtuvieron 1.2 $\mu\text{g/mL}$ de PPR en sobrenadante y 0.8 $\mu\text{g/mL}$ de PPR en pellet, esto a las 96 h.p.i. Se calcularon las diferentes velocidades específicas de producción tanto de EGFPVP2 y de PPR. La velocidad de producción de EGFPVP2 total (q_{EGFPVP2}) en el cultivo fue de 0.5 $\text{pmol}/10^6\text{cel}\cdot\text{h}$. La velocidad de degradación de EGFPVP2_d (q_{EGFPVP2d}) fue de 0.054 $\text{pmol}/10^6\text{cel}\cdot\text{h}$ y la concentración final del degradado de 1.43 nmol/mL . La q_{EGFPVP2d} fue un orden de magnitud menor que la q_{EGFPVP2} . Una gran cantidad de EGFPVP2 producida no fue utilizada para la formación de PPR, ya que se quedó adherida en las células probablemente como nucleocápsides. La q_{EGFPVP2r} fue de 0.378 $\text{pmol}/10^6\text{cel}\cdot\text{h}$ y se alcanzó una concentración de 8.91 nmol/mL de EGFPVP2. De la concentración total de EGFPVP2 en el cultivo (13.03 nmol/mL) sólo 2.69 nmol/mL se ensamblaron en PPR (25% de la EGFPVP2). Ya que no fue posible determinar la concentración de tIPPR en la muestra, se realizó una coinfección para producir dIPPR (células coinfectadas con dos baculovirus, bacEGFPVP2 y bacVP6), con la finalidad de que las diferencias que existen entre ambas producciones nos permitirían determinar o predecir la relación entre estas partículas.

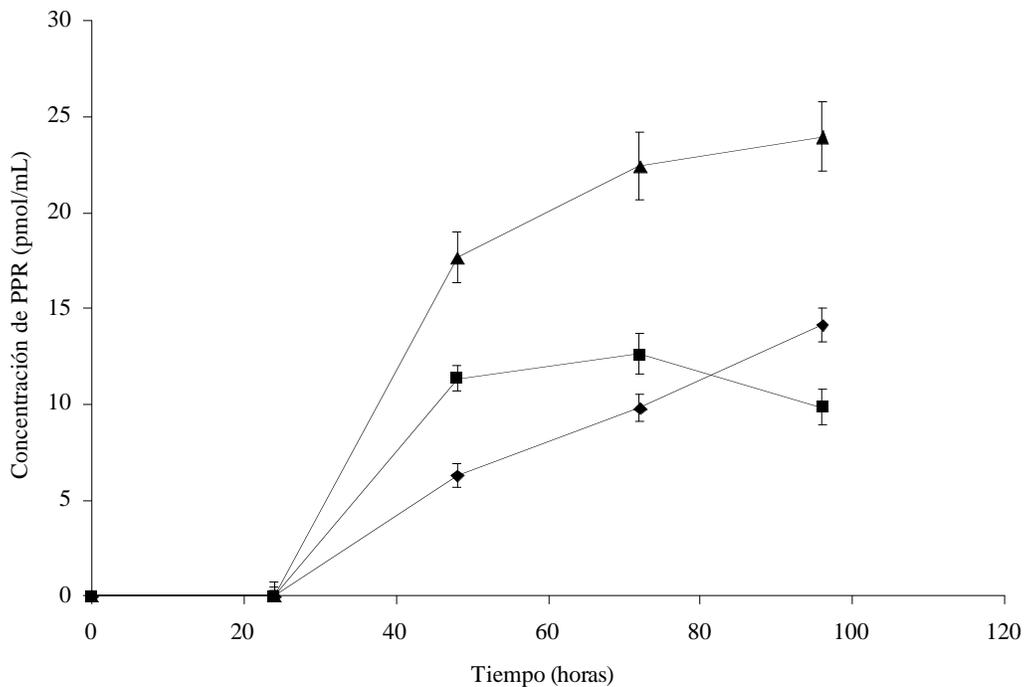


Figura 5.44. Producción de PPR en coinfecciones con 3 baculovirus. Sobrenadante (♦), pellet lisado (■) y total (▲).

5.5.3. CINÉTICA DE PRODUCCIÓN DE dIPPR

Se infectaron células de insecto a una MDI de 1 ufp/cel para cada baculovirus. Se tomaron muestras cada 24 horas analizando viabilidad y Xt (Ver Figura 5.45.). También se analizaron las diferentes fracciones del cultivo como en la coinfección con 3 baculovirus (pellet lisado, sobrenadante, pellet retenido y la degradación de EGFPVP2).

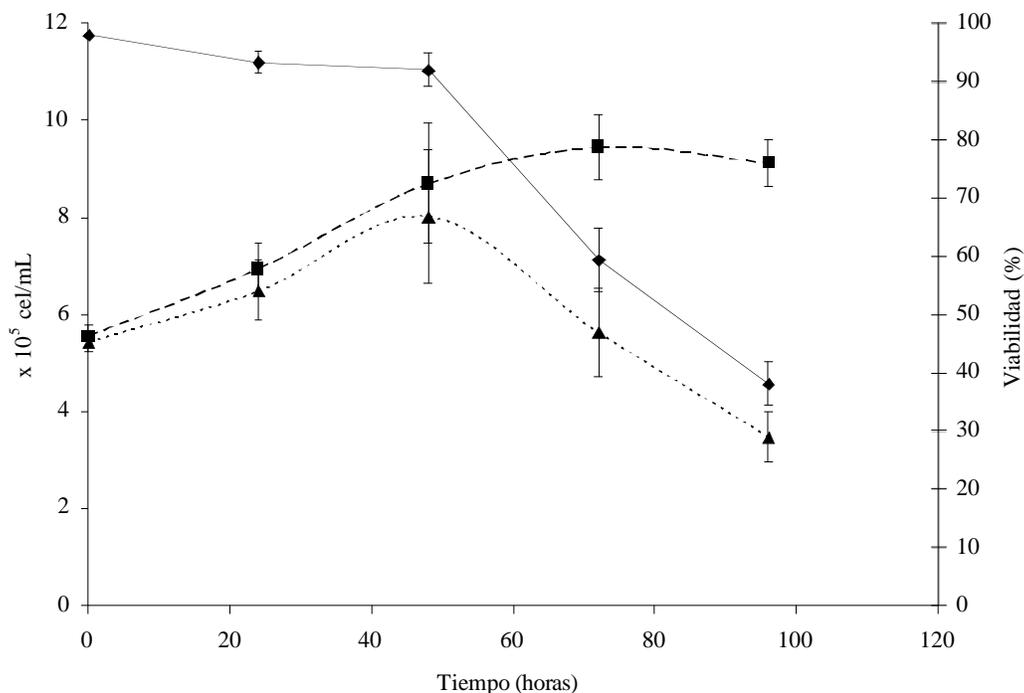


Figura 5.45. Cinética de crecimiento de un cultivo coinfectado con 2 baculovirus, bacEGFPVP2 y bacVP6. Viabilidad celular (♦), Xt (■) y Xv (▲).

Como se muestra en la Figura 5.45. el comportamiento de la cinética fue similar que en la coinfección con 3 baculovirus (Ver Fig. 5.39.). Las muestras de sobrenadante y pellet se analizaron en el HPLC y espectrofluorímetro para cuantificar la EGFPVP2 producida.

En el cromatograma que se muestra en la Figura 5.46., se observa la presencia de la dIPPR eluyendo alrededor de los 15 minutos. También se observa la degradación de EGFPVP2 en EGFP, la cual fue mayor que la observada en el cultivo coinfectando con 3 baculovirus. Se analizó la concentración de EGFPVP2 en las diferentes fracciones del cultivo, y se cuantificó la concentración de dIPPR. Como se muestra en la Figura 5.46., a diferencia de la coinfección con 3 baculovirus, hubo una mayor degradación de EGFPVP2. Esta degradación fue 22.6 veces

mayor que en la producción de tIPPR, alcanzándose una concentración de EGFPVP2 degradada de 51.04 nmol/mL (6.12 $\mu\text{g/mL}$). La mayor degradación observada durante la expresión de sólo VP2 y VP6 podría indicar que la presencia de VP7 aumenta la eficiencia de ensamblaje. La concentración total de EGFPVP2 producida fue de 65.23 nmol/mL (7.83 $\mu\text{g/mL}$), lo que es 5 veces mayor a la EGFPVP2 producida en la coinfección con 3 baculovirus. Esto indica que no existe limitación de EGFPVP2 para la producción de dIPPR, aunque se conoce que el ensamblaje en dIPPR es también dependiente de la disponibilidad de VP6 (Mena, 2007). Solamente 6 nmol/mL (0.72 $\mu\text{g/mL}$) se ensamblan en dIPPR (Ver Figuras 5.47. y 5.48.).

La concentración final de dIPPR en el cultivo fue de 2.47 $\mu\text{g/mL}$ (49.4 pM) (Ver Fig. 5.49.) valor similar al reportado por Mena (2007), quien alcanzó en sus cultivos 3.1 $\mu\text{g/mL}$ de dIPPR (62 pM).

Se calculó el % de ensamblaje de EGFPVP2 en dIPPR, que fue de 9.2%, 2.7 veces menor que en la producción de PPR coinfectando con 3 baculovirus. Aunque fue mayor la concentración final de EGFPVP2 en la producción de dIPPR, el ensamblaje de EGFPVP2 en dIPPR fue menos eficiente que en las coinfecciones con 3 baculovirus.

En la Figura 5.49. se muestra la cinética de producción de dIPPR. La mayor concentración de dIPPR se encontró en el pellet lisado y no en el sobrenadante, como en la coinfección con 3 baculovirus. Se determinaron las concentraciones molares de PPR en ambas coinfecciones y se observó, que aunque existe una mayor degradación de EGFPVP2, se produce el doble de PPR (moles base cores) en la coinfección con 2 baculovirus (50 pmol/mL contra 23 pmol/mL en las coinfecciones con 3 baculovirus). Cabe señalar que la partícula tIPPR tiene un peso molecular mayor que la dIPPR, por lo que si se comparan las concentraciones en $\mu\text{g/mL}$ son similares (2.4 $\mu\text{g/mL}$ en las coinfecciones con 2 baculovirus y 2 $\mu\text{g/mL}$ en las coinfecciones con 3).

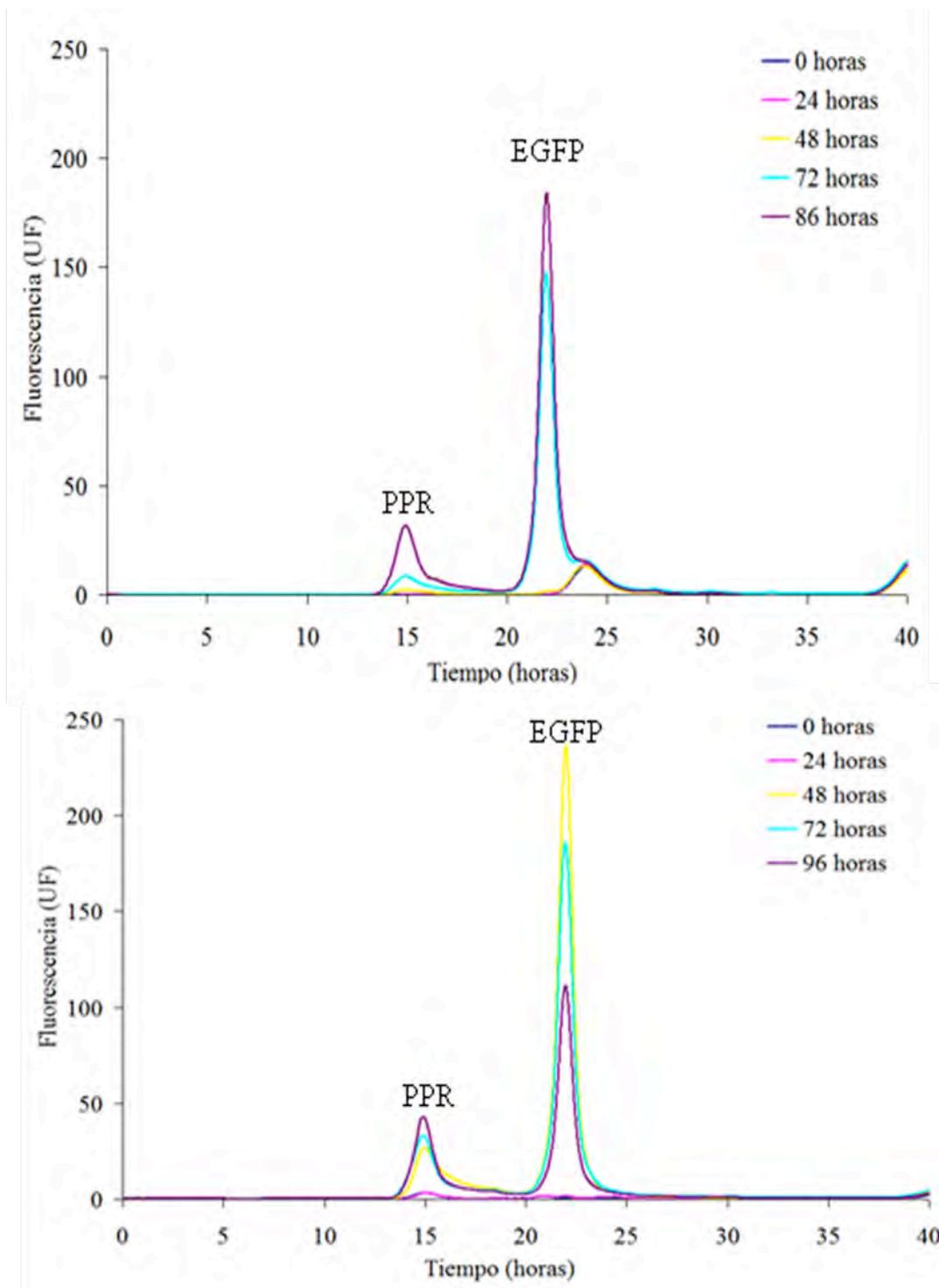


Figura 5.46. Análisis por HPLC de muestras de cultivo en la producción de dIPPR. A) Sobrenadante, B) Pellet.

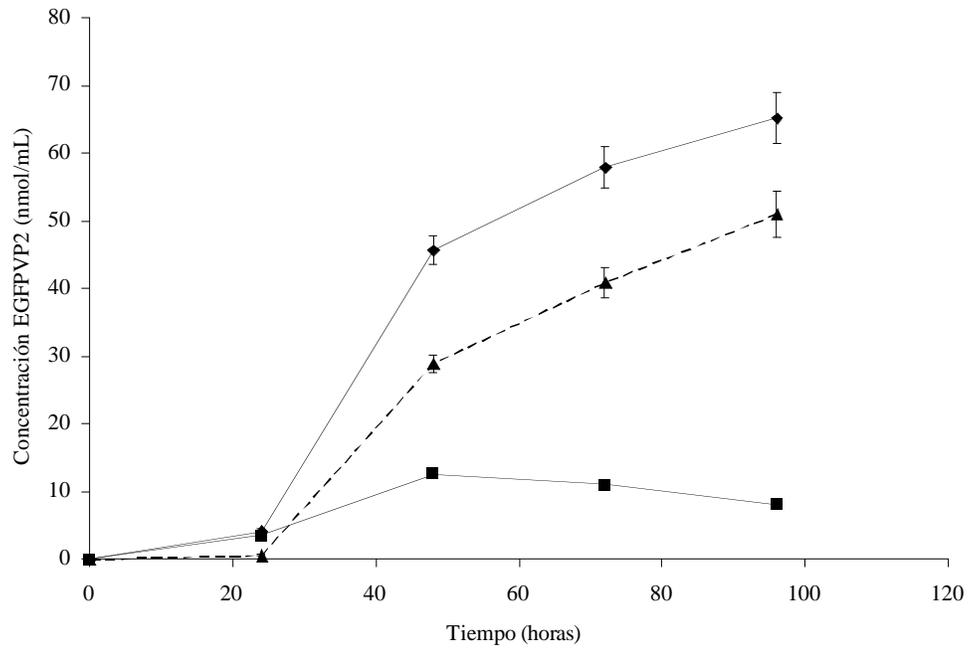


Figura 5.47. EGFPVP2 en diferentes fracciones de cultivo en la coinfección con 2 baculovirus. EGFPVP2 total (◆), EGFPVP2 en pellet retenido (■) y EGFPVP2 degradada (▲).

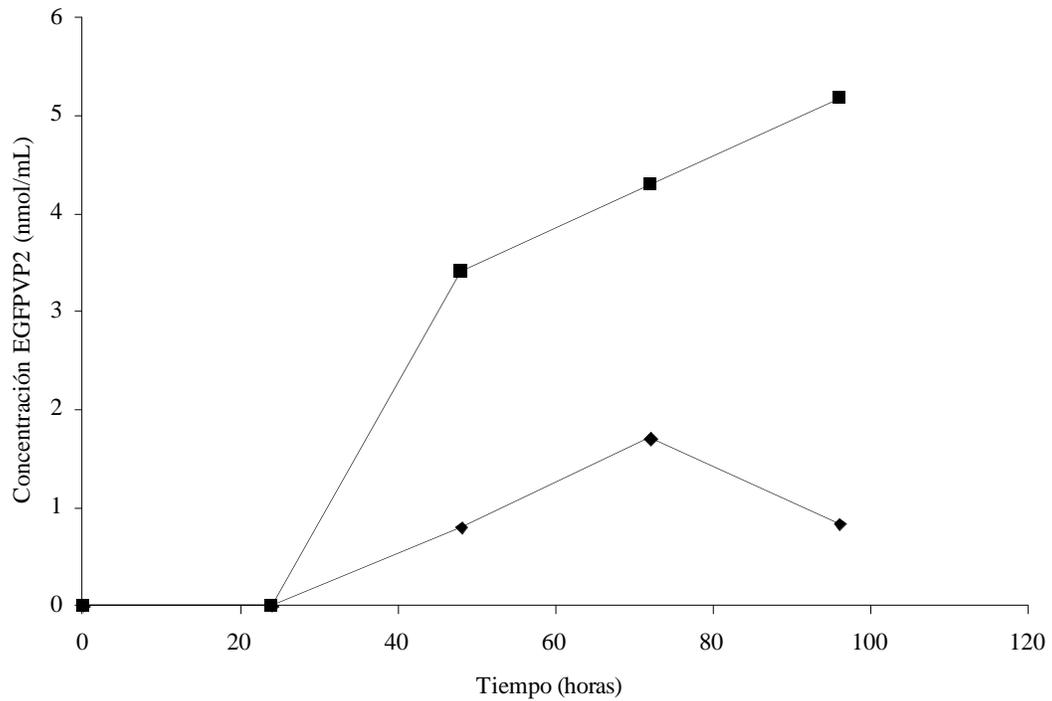


Figura 5.48. EGFPVP2 en sobrenadante y pellet lisado en la coinfección con 2 baculovirus. Sobrenadante (◆) y pellet lisado (■).

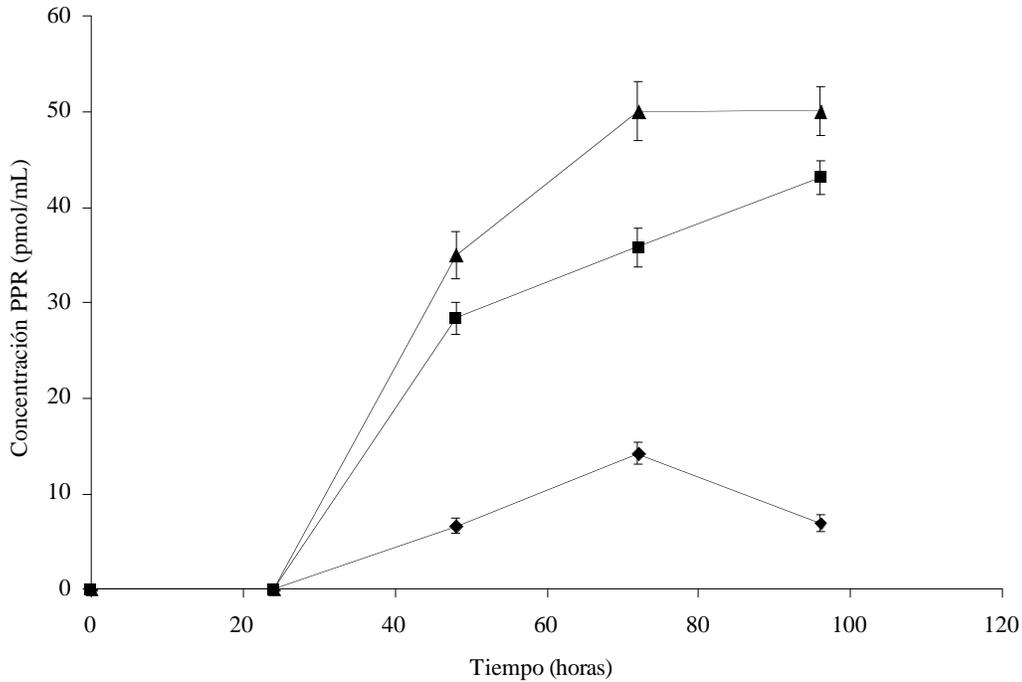


Figura 5.49. Producción de dIPPR en cultivo coinfectado con bacEGFPVP2 y bacVP6. Se puede observar el pellet (◆), sobrenadante (■) y total (▲).

En la Tabla 5.7 se muestran los diferentes parámetros cinéticos y estequiométricos calculados en este trabajo. El % de ensamblaje se calculó con base en la EGFPVP2 ensamblada en PPR en ambas producciones y la EGFPVP2 total producida en ambos cultivos, considerando tanto sobrenadante, pellet lisado, pellet retenido y EGFPVP2 degradada.

Como anteriormente se describió, en este trabajo no fue posible determinar la relación de dIPPR y tIPPR en muestras de cultivo. La comparación de ambos procesos de producción y sobretodo, el cálculo de la eficiencia de ensamblaje y la degradación de EGFPVP2, nos hace pensar en que VP7 tiene un efecto favorable en el ensamblaje de la PPR. La disminución en la velocidad específica de producción de EGFPVP2 en la coinfección con 3 baculovirus puede deberse a que la célula está produciendo una proteína adicional (VP7), la que no se produce en la coinfección con dos baculovirus y que además, podría ser responsable de la salida de las PPR producidas al sobrenadante.

Tabla 5.7. Parámetros cinéticos y estequiométricos calculados en la coinfección con 3 baculovirus (tIPPR) y 2 baculovirus (dIPPR).

Parámetro	Coinfección con bacEGFPVP2 y bacVP6	Coinfección con bacEGFPVP2, bacVP6 y bacVP7
q_{EGFPVP2} (pmol/10 ⁶ cel h)	1.015	0.500
q_{EGFPVP2d} (pmol/10 ⁶ cel h)	0.794	0.054
q_{EGFPVP2r} (pmol/10 ⁶ cel h)	0.372	0.378
q_{PPR} (pmol/10 ⁶ cel h)	0.008	0.004
[EGFPVP2] (nmol/mL)	65.230	13.030
[EGFPVP2d] (nmol/mL)	51.050	2.260
[EGFPVP2r] (nmol/mL)	12.575	9.890
[PPR] (nmol/mL)	0.543	0.108
Eficiencia de ensamblaje _{EGFPVP2}	9.2	25.0
% PPR en sobrenadante	20.0	53.0

q_{EGFPVP2} , velocidad específica de producción de EGFPVP2 total. q_{EGFPVP2d} , velocidad específica de degradación de EGFPVP2. q_{EGFPVP2r} , velocidad específica de producción de EGFPVP2 insoluble. q_{PPR} , velocidad de producción de PPR.

Capítulo 6

Conclusiones

- La cromatografía de exclusión molecular (HPLC-GP) no permitió diferenciar entre PPR de doble y triple capa, pero sí permitió cuantificar la concentración de PPR (dlPPR y tlPPR) en el cultivo.
- Se intentó cuantificar y diferenciar dlPPR y tlPPR quitando la VP6 de la dlPPR. Este acercamiento no tuvo éxito probablemente por la agregación de las nucleocápside que se generan por el desensamblaje de la dlPPR, que también podrían interferir con la cuantificación por HPLC.
- Se desarrolló una nueva metodología para diferenciar entre dlPPR y tlPPR y cuantificarlas utilizando electroforesis capilar zonal con un capilar de sílica fundida. Se evaluó la metodología y se observó que esta no cumple con el paralelismo ya que no fue posible diferenciar dlPPR y tlPPR de muestras de cultivo. Aunque es importante señalar que se lograron analizar diferentes muestras purificadas en las cuales se logró diferenciar entre ambas PPR.
- La producción de dlPPR fue menos eficiente que la producción de tlPPR, ya que la proporción de EGFPVP2 ensamblada en infecciones con 3 baculovirus fue 2.7 veces mayor que en infecciones con 2 baculovirus (9% para la dlPPR y 25% para la tlPPR). La mayor degradación de EGFPVP2 podría ser consecuencia de su baja eficiencia de ensamblaje durante la producción de la dlPPR y a su velocidad de producción.

Capítulo 7

Perspectivas

- Analizar si la metodología implementada (ECZ) en este trabajo puede diferenciar dIPPR y tIPPR de otras cepas de rotavirus. Además, hace falta analizar si es factible la separación de la PPR completa y diferenciarla de la dIPPR y tIPPR.
- Desarrollar un protocolo de purificación de muestras de cultivo coinfectado que permita analizar las muestras por ECZ para determinar la relación de dIPPR y tIPPR.
- Optimizar la separación de dIPPR y tIPPR con la finalidad de que estas migren con una separación mayor al flujo electrosmótico.
- Ya contando con una metodología que permita determinar la concentración de dIPPR y tIPPR en las muestras de cultivo coinfectado con 3 baculovirus será posible realizar infecciones a diferentes multiplicidades de infección que permita encontrar la mejor estrategia de infección para maximizar la producción de PPR.

Capítulo 8

Referencias

- Attallah A.M., Malak C.A.A., Elghawalby N.A., Saeta A.S., Abdel-Raouf M., Shina G.E. (2004). Identification of a specific marker for hepatitis C virus infection using capillary zone electrophoresis. *Clinica Chimica Acta*. 346(2): 171-179.
- Auricchio A., Hildinger M., O'Connor E., Gao G., 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.
- Berger I., Fitzgerald D.J., Richmond T.J. (2004). Baculovirus expression system for heterologous multiprotein complexes. *Nature Biotechnology*. 22(12): 1583-1587.
- Blutt S.E., Crawford S.E., Warfield K.L., Lewis D.E., Estes M.K., Conner M.E. (2004). The VP7 outer capsid protein of rotavirus induces polyclonal B-cell activation. *Journal of Virology*. 78(13): 6974-6981.
- Blutt S.E., Warfield K.L., O'Neil C.M., Estes M.K., Conner M.E. (2005). Host, viral, and vaccine factors that determine protective efficacy induced by rotavirus and virus-like particles (VLPs). *Vaccine*. 24(8):1170-1179.
- Benavides J., Mena J.A., Cisneros-Ruiz M., Ramírez O.T., Palomares L.A., Rito-Palomares M. (2006). Rotavirus-like particles primary recovery from insect cells in aqueous two-phase systems. *Journal of Chromatography B*. 842(1): 48-57.
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye-binding. *Analytical Biochemistry*. 72, 248-254
- Breadmore M.C., Theurillat R., Thormann W. (2004). Determination of ribavirin in human serum and plasma by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 25(10-11):1615-1622.
- Boisgérault F., Morón G., Leclerc C. (2002). Virus-like particles : a new family of delivery systems. *Expert Review of Vaccines*. 1(1): 101-109.
- Camilleri P. (1998). History and development of capillary electrophoresis: Camilleri P. (Ed), *Capillary electrophoresis, theory and practice*. CRC Press, New York. pp. 1-22.

- Ceres P., Zlotnick A. (2002). Weak protein-protein interactions are sufficient to drive assembly of hepatitis B virus capsids. *Biochemistry*. 41(39): 11525-11531.
- Charpilienne A., Nejmeddine M., Berois M., Perez N., Neumann E., Hewat E., Trugnan G., Cohen J. (2001). Individual rotavirus-like particles containing 120 molecules of fluorescent protein are visible in living cells. *Journal of Biological Chemistry*. 276(31): 29361-29367.
- Chiari M., Nesi M., Righetti P.G. (1996). Surface modifications of silica walls: A review of different methodologies, in: Righetti P.G. (Ed), *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*. CRC Press, New York. pp. 1-36.
- Crawford S.E., Labbe M., Cohen J., Burroughs M.H., Zhou Y., Estes M. (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *Journal of Virology*. 68(9): 5945-5952.
- Cruz P.E., Cunha A., Peixoto C.C., Clemente J., Moreira J.L., Carrondo M.J.T. (1998). Optimization of the production of virus-like particles in insect cells. *Biotechnology and Bioengineering*. 60(4): 408-418.
- Dormitzer P.R., Greenberg H.B., Harrison S.C. (2000). Purified recombinant rotavirus VP7 forms soluble, calcium-dependent trimers. *Virology*. 277(2): 420-428.
- Dormitzer P.R., Nason E.B., Prasad B.V.V., Harrison S.C. (2004). Structural rearrangements in the penetration membrane protein of a non-enveloped virus. *Nature*. 430(7003): 1053-1058.
- Douglas T., Young M. (1998). Host-guest encapsulation of materials by assembled virus proteins cages. *Nature*. 393: 152-155.
- Dyall-Smith M.L, Lazdins I, Tregear GW, Holmes I.H. (1986). Location of the major antigenic sites involved in rotavirus serotype-specific neutralization. *PNAS*. 83(10): 3465-3468.
- Estes M.K., Cohen J. (1989). Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews*. 53(4): 410-449.
- Estes M.K. (2001). Rotavirus and their replication in: Knipe D.M., Howley P.M. et al. (eds) *Fields Virology* 4th ed. Lippincott, Williams and Wilkins, Philadelphia. pp. 1747-1785.

- Erk I., Huet J.C., Duarte M., Duquerroy S., Rey F., Cohen J., Lepault J. (2003). A zinc ion controls assembly and stability of the major capsid protein of rotavirus. *Journal of Virology*. 77(6): 3595-3601.
- Foley J.P., Dorsey J.G. (1983). Equations for calculation of chromatographic figures of merit for ideal and skewed peaks. *Analytical Chemistry*. 55: 730-737.
- Gallo-Ramírez L.M. (2007). Estudio de la producción de vectores de virus adeno-asociado tipo 2 en el sistema de células de insecto-baculovirus. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Gao G., Qu G., Burnham M.S., Huang J., Chirmule N., Joshi B., Yu Q., Marsh J.A., Conceicao C.M., Wilson J.M. (2000). Purification of recombinant adeno-associated virus vectors by column chromatography and its performance *in vivo*. *Human Gene Therapy*. 11: 2079-2091.
- Gentsch J.R., Laird A.R., Bielfelt B., Griffin D.D., Banyai K., Ramachandran M., Jain V., Cunliffe N.A., Nakagomi O., Kirkwood C.D., Fischer T.K., Parashar U.D., Bresee J.S., Jiang B., Glass R.I. (2005). Serotype diversity and reassortment between human and animal rotavirus strains: implications for rotavirus vaccine programs. *The Journal of Infectious Diseases*. 192(1): 146-159.
- Gilbert J.M., Greenberg H.B. (1997). Virus-like particle-induced fusion from without in tissue culture cells: role of outer layer proteins VP4 and VP7. *Journal of Virology*. (1997). 71(6): 4555-4563.
- Gilbert J.M., Feng N., Patton J.T., Greenberg H.B. (2001). Rotavirus assembly-interaction of surface protein VP7 with middle layer protein VP6. *Archives in Virology*. 146(6): 1155-1171.
- Goicochea N.L., De M., Rotillo V.M., Mukhopadhyay S., Dragnea B. (2007). Core-like particles of an enveloped animal virus can self-assemble efficiently on artificial templates. *Nano Letters*. 7(8): 2281-2290.
- Goodridge L., Goodridge C., Wu J., Griffiths M., Pawliszyn. (2004). Isoelectric point determination of norovirus virus-like particles by capillary electrophoresis focusing with whole column imaging detection. *Analytical Chemistry*. 74(1): 48-52.

- Hjerten S., Elenbring K., Kilar F., Liao J. (1987). Carrier-free zone electrophoresis, displacement electrophoresis and isoelectric focusing in a high-performance electrophoresis apparatus. *Journal of Chromatography*. 403: 47-61.
- ICH Harmonized tripartite guideline: Validation of analytical procedures: Methodology: Q2 (R1). (1996).
- Iqbal J., Scapozza L., Folkers G., Müller C.E. (2007). Development and validation of a capillary electrophoresis method for the characterization of herpes simplex virus type I (HSV-1) thymidine kinase substrates and inhibitors. *Journal of Chromatography B*. 846(1-2): 281-290.
- Isa P, Gutiérrez M., Arias C.R., López S. (2008). Rotavirus cell entry. *Future Virology*. 3(2): 135-146.
- Jarvis D.L., García A. Jr. (1994). Biosynthesis and processing of the *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus gp64 protein. *Virology*. 205: 300-313.
- Jiang B., Barniak V., Smith R.P., Sharma R., Corsaro B., Hu B., Madore P. (1998). Synthesis of rotavirus-like particles in insect cells: comparative and quantitative analysis. *Biotechnology and Bioengineering*. 60(3): 369-374.
- Jumppanen J., Riekkola M. (1995). Marker techniques for high-accuracy identification in CZE. *Analytical Chemistry*. 67: 1060-1066.
- Kabcenell A.K., Poruchynsky M.S., Bellamy A.R., Greenberg H.B., Atkinson P.H. Two forms of VP7 are involved in assembly of SA11 rotavirus in endoplasmic reticulum. *Journal of Virology*. 62(8): 2929-2941.
- Kapikian A.Z., Hoshino Y. (2007). To serotype or not serotype: That is still the question. *The Journal of Infectious Diseases*. 195: 611-614.
- Khamrin P., Maneekarn N., Peerakome S., Chan-it W., Yagyu F., Okitsu S., Ushijima H. (2007). Novel porcine rotavirus of genotype P[27] shares new phylogenetic lineage with G2 porcine rotavirus strain. *Virology*. 361: 243-252.
- Kost T.A., Condreay J.P., Jarvis D.L. (2005). Baculovirus as versatile vectors for protein expression in insect and mammalian cells. *Nature Biotechnology*. 23(5): 567-575.
- Kremser L., Blass D., Kenndler E. (2004). Capillary electrophoresis of biological particles: viruses, bacteria and eukaryotic cells. *Electrophoresis*. 25(14): 2282-2291.

- Kremser L., Petsch M., Blaas D., Kenndler E. (2006). Influence of detergent additives on mobility of native and subviral rhinovirus particles in capillary electrophoresis. *Electrophoresis*. 27(5-6): 1112-1121.
- Kremser L., Bilek G., Blaas D., Kenndler E. (2007). Capillary electrophoresis of viruses, subviral particles and virus complexes. *Journal of Separation Science*. 30 : 1704-1713.
- Labbé M., Chapilienne A., Crawford S., Estes M.K., Cohen J. (1991). Expression of rotavirus VP2 produces empty corelike particles. *Journal of Virology*. 65(6): 2946-2952.
- Lawton J.A., Zeng C.Q., Mukherjee S.K., Cohen J., Estes M.K., Prasad B.V.V. (1997). Three-dimensional structure analysis of recombinant rotavirus-like particles with intact and amino-terminal deleted VP2: Implications for the architecture of the VP2 capsid layer. *Journal of Virology*. 71(10): 7353-7360.
- Lenz P., Thompson C.D., Day P.M., Bacot S.M., Lowy D.R., Schiller J.T. (2003). Interaction of papillomavirus virus-like particles with human myeloid antigen-presenting cells. *Clinical Immunology*. 106(3): 231-237.
- Lepault J., Petitpas I., Erk I., Navaza J., Bigot D., Dona M., Vachette P., Cohen J., Rey F.A. (2001). Structural polymorphism of the major capsid protein of rotavirus. *EMBO Journal*. 20(7): 1498-1507.
- Le Potier I., Taverna M., Fatal E., Benzaki J., Chevalier M., Ferrier D. (2001). Performance evaluation of capillary surface treatments for peptide mapping by capillary zone electrophoresis. *Chromatographia*. 53: 563-570.
- Maan B., Traina J.A., Soderblom C., Murakami P.K., Lehmberg E., Lee D., Irving J., Nestaas E., Pungor E. (2000). Capillary zone electrophoresis of a recombinant adenovirus. *Journal of Chromatography A*. 895: 329-337.
- Mach H., Middaugh R., Denslow N.D. (1995). Determining the identity and purity of recombinant proteins by UV absorption spectroscopy. *Current Protocols in Protein Science*. 7.2.1.-7.2.21.
- Madore H.P., Estes M.K., Zarley C.D., Hu B., Parsons S., Digravio D., Grenier S., Smith R., Jiang B., Corsaro B., Barniak V., Crawford S., Conner M.E. (1998). Biochemical and immunologic comparison of virus-like particles for a rotavirus subunit vaccine. *Vaccine*. 17: 2461-2471.

- Mathieu M., Petitpas I., Navaza J., Lepault J., Kohli E., Pothier P., Prasad B.V.V., Cohen J., Rey F.A. (2001). Atomic structure of the major capsid protein of rotavirus implications for the architecture of the virion. *EMBO Journal*. 20(7): 1485-1497.
- Markovic I., Pulyaeva H., Sokoloff A., Chernomordik L.V. (1998). Membrane fusion mediated by baculovirus gp64 involves assembly of stable gp64 trimers into multiprotein aggregates. *Journal of Cell Biology*. 143(5): 1155-1166.
- Meera J.D., Armstrong D.W. (2003). Separation, identification and characterization of microorganism by capillary electrophoresis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(1): 38-51.
- Mena J.A., Ramírez O.T., Palomares L.A. (2003). Titration of non-included baculovirus using a cell viability assay. *Biotechniques*. 34(2): 260-264.
- Mena J.A. (2004). Estudio del ensamblaje de pseudo partículas virales de rotavirus en el sistema de células de insecto-baculovirus. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Mena J.A., Ramírez O.T., Palomares L.A. (2005). Quantification of rotavirus-like particles by gel permeation chromatography. *Journal of Chromatography B*. 824(1-2): 267-276.
- Mena J.A., Ramírez O.T., Palomares L.A. (2006). Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *Journal of Biotechnology*. 122: 443-452.
- Mena J.A., Ramírez O.T., Palomares L.A. (2007). Populations kinetics during simultaneous infections of insect cells with two recombinant baculoviruses for the production of rotavirus-like particles. *BMC Biotechnology*. 7: 39.
- Mena J.A. (2007). Desarrollo de estrategias racionales de producción de pseudo partículas virales en el sistema de células de insecto baculovirus. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Méndez E., López S., Cuadras M.A., Romero P., Arias C.F. (1999). Entry of rotavirus is a multistep process. *Virology*. 263: 450-459.
- Noad R., Roy P. (2003). Virus-like particles as immunogens. *TRENDS in Microbiology*. 11(9): 438-444.

- Okun V., Ronacher B., Blass D., Kenndler E. (1999). Analysis of common cold virus (Human rhinovirus serotype 2) by capillary electrophoresis: The problem of peak identification. *Analytical Chemistry*. 71: 2028-2032.
- Okun V., Ronacher B., Blass D., Kenndler E. (2000). Capillary electrophoresis with postcolumn infectivity assay for the analysis of different serotypes of human rhinovirus (common cold virus). *Analytical Chemistry*. 72(11): 2553-2558.
- O'Neil C.M., Crawford S.E., Estes M.K., Conner M.E. (1997). Rotavirus virus-like particles administered mucosally induce protective immunity. *Journal of Virology*. 71(11): 8707-8717.
- Olechno J.D., Nolan J.A. (1996). Injection methods in capillary electrophoresis, In: Riguetti P.G. (Ed), *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*. CRC Press, New York. pp. 1-36.
- Palomares L.A., Estrada-Mondaca S., Ramírez O.T. (2006). Principles and applications of the insect-cell-baculovirus expression vector system, In: Ozturk S.S., Hu W.S. (Eds.), *Cell Culture Technology for Pharmaceutical and Cellular Applications*. Taylor and Francis, Nueva York. pp. 627-692.
- Parashar U.D., Gibson C.J., Bresee J.S., Glass R.I. (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infections Diseases*. 12(2): 304-306.
- Pattenden L.K., Middelberg A.P.J., Niebert M., Lipin D.L. (2005). Towards the preparative and large-scale precision manufacture of virus-like particles. *Trends in Biotechnology*. 23(10): 523-529.
- Patton J.T., Spencer E. (2000). Genome replication and packaging of segmented double stranded RNA viruses. *Virology*. 277(2): 217-225.
- Patton J.T., Chizhikov V., Taraporewala Z., Chen D. (2000). Virus replication, In: Gray J, Desselberger (Eds), *Methods in molecular medicine: Rotaviruses, Methods and Protocols*. Human Press, New Jersey. pp. 33-66.
- Peixoto C., Sousa M.F.Q., Silva A.C., Carrondo M.J.T., Alves P.M. (2007). Downstream processing of the triple layered rotavirus like particles. *Journal of Biotechnology*. 127(3):452-61.

- Pérez J.F., Ruiz M.C., Chemello M.E., Michelangeli F. (1999). Characterization of a membrane calcium pathway induced by rotavirus infection in cultured cells. *Journal of Virology*. 73(3): 2481-2490.
- Perez-Vargas J., Isa P., López S., Arias C.F. (2006). Rotavirus vaccine: Early introduction in latin american-risk and benefits. *Archives in Medical Research*. 37(1): 1-10.
- Pesavento J.B., Crawford S.E., Estes M.K., Venjataras Prasad B.V. (2006). Rotavirus proteins: structure and assembly. Roy P. (Eds.). *Reoviruses: Entry, Assembly and Morphogenesis*. Current Topics in Microbiology and Immunology. 309: 189-219.
- Peterson S.E., Wang S., Ranheim T., Owen K.E. (2006). Citrate-mediated disaggregation of rotavirus particles in Rotateq[®] vaccine. *Antiviral Research*. 69: 107-115.
- Phelps D.K., Speelman B., Post B.C. (2000). Theoretical studies of viral capsid proteins. *Current Opinion in Structural Biology*. 10: 170-173.
- Prasad B.V.V., Burns J.W., Marietta E., Estes M.K., Chiu W. (1990). Localization of VP4 neutralization sites in rotavirus by three-dimensional cryo-electron microscopy. *Nature*. 343(6257): 476-479.
- Ready K.F.M., Sabara M.I.J., Babiuk L.A. (1988). *In vitro* assembly of the outer capsid of bovine rotavirus is calcium dependent. *Virology*. 167(1): 269-273.
- Reimerik J.H.J., Boshuizen J.A., Einerhand A.W.C., Duizer E., Amorongen G.V., Schmidt N., Koopmans M.P.G. (2007). Systemic immune response after rotavirus inoculation of neonatal mice depends on source and level of purification of the virus: implications for the use of heterologous vaccine candidates. *Journal of General Virology*. 88(2): 604-612.
- Reudl C., Storni T., Lechner F., Bachi T., Bachmann M.F. (2002). Cross-presentation of virus-like particles by skin-derived CD8(-) dendritic cells: a dispensable role for TAP. *European Journal of Immunology*. 32(3): 818-825.
- Righetti P.G., Gelfi C., Chiari M. (1996). Isoelectric focusing in capillaries, In: Righetti P.G. (Ed), *Capillary Electrophoresis in Analytical Biotechnology*. CRC Press, New York. pp. 509-539.
- Roy P., Mikhailov M., Bishop D.H.L. (1997). Baculovirus multigene expression vectors and their use for understanding the assembly process of architecturally complex virus particles. *Gene*. 190(1): 119-129.

- Ruiz M.C., Charpilienne A., Liprandi F., Gajardo R., Michelangeli F., Cohen J. (1996). The concentration of Ca^{+2} that solubilizes outer capsid proteins from rotavirus particles is dependent on the strain. *Journal of Virology*. 70(8): 4877-4883.
- Ruiz M.C., Cohen J., Michelangeli F. (2000). Role of Ca^{+2} in the replication and pathogenesis of rotavirus and other viral infections. *Cell Calcium*. 28(3): 137-149.
- Sabara M., Parker M., Aha P., Cosco C., Gibbons E., Parsons S., Babiuk L. (1991). Assembly of double-shelled rotavirus like particles by simultaneous expression of recombinant VP6 and VP7 proteins. *Journal of Virology*. 65(12): 6994-6997.
- Santos N., Hoshino Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Reviews in Medical Virology*. 15: 25-56.
- Schnabel U., Groiss F., Blass D., Kenndler E. (1996). Determination of the pI of human rhinovirus serotype 2 by capillary isoelectric focusing. *Analytical Chemistry*. 68(23): 4300-4303.
- Shambaugh C.L., Bodmen J.L., Hsu D., Ranucci C.S. (2004). Separation and quantification of viral double-stranded RNA fragments by capillary electrophoresis in hydroxyethylcellulose polymer solutions. *Journal of Chromatography A*. 1051: 161-170.
- Trask S.D., Dormitzer P.R. (2006). Assembly of highly infectious rotavirus particles recoated with recombinant outer capsid proteins. *Journal of Virology*. 80(22): 11923-11934.
- Vieira H.L.A., Estevao C., Roldao A., Peixoto C.C., Sousa M.F.Q., Cruz P.E., Larrondo M.J.T., Alves P.M. (2005). Triple layered VLP production: kinetics of vector replication, mRNA stability and recombinant protein production. *Journal of Biotechnology*. 120(1): 72-82.
- Ye L., Lin Y., Bennouna S., Lo M., Wu Q., Bu Z., Pulendran B., Compans R., Yang C. (2006). Ebola virus-like particles produced in insect cells exhibit dendritic cell stimulating activity and induce neutralizing antibodies. *Virology*. 1 (351): 260-270.
- Yeager M., Berriman J.A., Baker T.S., Bellamy A.R. (1994). Three-dimensional structure of the rotavirus haemagglutinin VP4 by cryo-electron microscopy and difference map analysis. *EMBO Journal*. 13(5): 1011-1018.

- Zeng C.Q., Estes M.K., Chapilienne A., Cohen J (1989). The N-Terminus of rotavirus VP2 is necessary for encapsidation of VP1 and VP3. *Journal of Virology*. 72(1): 201-208.
- Zlotnick A. (2003). Are weak protein- protein interactions the general rule in capsid assembly? *Virology*. 315(2): 269-274.