

CUANTIFICACIÓN DE ADN VIRAL EN INFECCIONES DE CÉLULAS DE INSECTO PARA LA PRODUCCIÓN DE VECTORES DE VIRUS ADENO-ASOCIADO TIPO 2

Lilí E. Gallo-Ramírez, Octavio Tonaituh Ramírez, Laura A. Palomares.
 IBT-UNAM Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa, C.P. 62210, Cuernavaca, Morelos.
 Fax: (777) 3138811. E-mail: liligr@ibt.unam.mx

Palabras clave: Virus adeno-asociado tipo 2 (VAA-2), genoma recombinante, RT-PCR cuantitativo.

Introducción. La producción de vectores de virus adeno-asociado (vVAA) en células de insecto representa una alternativa viable a gran escala. Para ello se utilizan baculovirus que expresan los componentes de VAA-2 tales como: las proteínas de cápside, el genoma recombinante del vVAA-2 (el gen de GFP flanqueado por las ITR de VAA-2), y proteínas no estructurales que participan en la liberación del genoma recombinante a partir del ADN del baculovirus, en su replicación y su empaquetamiento en cápsides [1]. En coinfecciones se han obtenido rendimientos de cápsides virales hasta 10^3 veces más altos que los de partículas con capacidad transductora (PT) [2]. Hasta el momento se desconoce si la replicación del genoma limita la producción de PT al no proporcionar suficiente ADN para empaquetarse en cápsides. Por tanto el propósito de este trabajo ha sido evaluar la producción de genomas de vVAA-2 en células de insecto utilizando RT-PCR cuantitativo y desarrollar un método que permita diferenciar los genomas de vVAA-2 integrados al ADN del baculovirus BacGFP de aquellos genomas libres disponibles de empaquetarse.

Metodología. Se desarrollaron curvas de cuantificación usando como templado diluciones seriales del genoma recombinante de VAA-2 clonado en el vector pFBGR [1], así como un fragmento del gen p35 de baculovirus clonado en pCR®8/GW/TOPO®. Se diseñaron oligos para amplificar el gen de GFP y de p35. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador de tiempo real Rotor-Gene 600 (Corbett). Como muestras problema se infectaron células H5 a diferentes MDI con BacGFP. El ADN se purificó utilizando columnas Nanosep.

Resultados y discusión. Se obtuvieron curvas de cuantificación para GFP y p35 con parámetros de pendiente (M) y eficiencia cercanos a los óptimos (M=-3.2 y Eficiencia=1.0) (tabla 1). El número de copias de GFP (cGFP) en muestras problema indica el número de genomas de vVAA totales detectados en pellet (figura 1). A partir de las 6 hpi se observó que el número de cGFP fue mayor conforme aumentó la MDI, del mismo modo el número de cGFP aumentó con el tiempo después de 6hpi para todas las MDI. A 0.1 y 1 UFP/cél se observó que al tiempo 0 el número de cGFP fue mayor que a las MDI mayores, esto podría deberse a que el tiempo de contacto entre el virus y las células antes de tomar la muestra fue mayor para las MDI menores. La posterior

caída de cGFP puede atribuirse a la degradación de ADN viral tras infecciones no exitosas, las cuales son más probables cuando se utilizan bajas MDI. Actualmente se está trabajando en la cuantificación de ADN de baculovirus en estas muestras utilizando el gen p35 lo que ayudará a corroborar los datos obtenidos con GFP.

Cuadro 1. Parámetros de curvas de cuantificación obtenidas por RT-PCR cuantitativo.

Gen	Rango de cuantificación	M	Eficiencia	R ²
GFP	10^2 - 10^8 copias/rx	-3.26	1.02	0.999
p35	10^1 - 10^8 copias/rx	-3.60	0.90	0.999

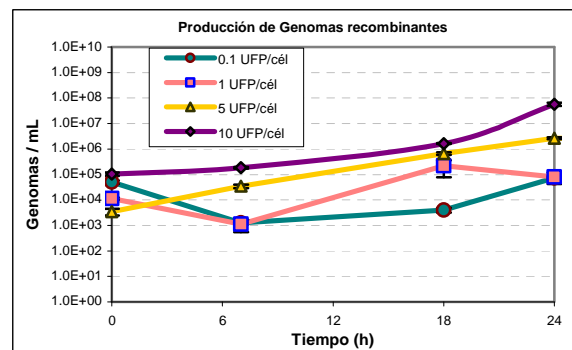


Fig. 1. Cuantificación del gen GFP en ADN obtenido de pellet de células infectadas con BacGFP a distintas MDI.

Conclusiones. El método desarrollado resultó efectivo para evaluar la replicación de genomas de vVAA-2 en células de insecto y podrá emplearse para cuantificar genomas encapsulados. También resultó útil para monitorear el proceso de infección y replicación de baculovirus lo cual resulta de interés para la producción de otras partículas pseudo-virales usando este sistema.

Agradecimiento. PAPIIT-UNAM IN223805 y SEP-CONACyT 46225-Z.

Bibliografía.

- Urabe, M., Ding, CH., Kotin, R. M. (2002) Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type-2 vectors. *Hum. Gene Ther.* 13: 1935-1943.
- Aucoin, M. G., Perrier, M., Kamen, A. A. (2006). Production of Adeno-associated viral vectors in insect cells using triple infection: Optimization of baculovirus concentration ratios. *Biotechnol. Bioeng.* 95 (6): 1081-1092.