



DISEÑO DE UN SISTEMA DE MONITOREO DE ESPECIES REACTIVAS DE OXIGENO Y POTENCIAL REDOX INTRACELULAR EN EL SISTEMA CÉLULAS DE INSECTO-BACULOVIRUS.

Israel Montes de Oca, Laura A. Palomares y William A. Rodríguez-Limas. Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos, 62210, israelb@ibt.unam.mx.

Palabras clave: Baculovirus, especies reactivas de oxígeno, roGFP2, células de insecto, potencial redox

Introducción.

El sistema células de insecto-baculovirus es utilizado para la producción de proteínas recombinantes que actualmente están en el mercado farmacéutico. El uso de este sistema involucra la infección de células de insecto con baculovirus, lo que se ha demostrado resulta en la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), alterando el entorno intracelular [1]. El presente proyecto se centra en el uso de la proteína roGFP2, la que tiene la propiedad de reaccionar especies reactivas de oxígeno, cambiando sus propiedades de fluorescencia intrínseca [2]. Como marcador molecular, permite la observación y cuantificación, en tiempo real, del cambio de potencial intracelular en las células de insecto. Durante la infección por baculovirus a diferentes multiplicidades de infección (MOI), se evaluó este cambio para conocer la relación entre la cantidad de virus agregado al sistema y la oxidación generada.

Metodología

Construcción del baculovirus recombinante. Se recibió el plásmido pEGFP2-N1, donado por James Remington de la Universidad de Oregon, que contiene el gen roGFP2 para expresión en células de mamífero. Este fue utilizado para aislar el gen de roGFP2 y transferirlo al vector pFastBac1, bajo el promotor de *polh* para expresión en células de insecto. La construcción del baculovirus fue realizada a través del sistema Bac to Bac® (Life Technologies).

Cinéticas de infección con células High Five (*Trichoplusia ni*)

Se usaron células de insecto High Five (*Trichoplusia ni*), cultivadas a 27°C y agitadas a 110 rpm. Se realizaron 3 cinéticas de infección evaluando las MOI de 0.1, 1, y 5, ufp/cél. Se observó la expresión de la proteína recombinante y la relación de la fluorescencia excitando a 405 o a 488 nm, midiendo la emisión de luz a 510 nm. Se calcula la relación entre las intensidades de fluorescencia emitidas excitando a 405 nm y a 488 nm. Una relación de intensidades cercana a 1 representa al sistema más oxidado y valores cercanos a cero, el más reducido.

Resultados.

Durante la construcción del baculovirus recombinante, se monitoreó el fenómeno de transfección y amplificación de

la progenie viral por epifluorescencia en un microscopio invertido Nikon TE 300 (Fig.1)

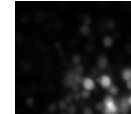


Fig.1 Células expresando roGFP2

Una vez construido el baculovirus, se realizaron cinéticas de infección. La relación entre las emisiones obtenidas excitando a 405 o 488 nm se muestra en la Fig. 2. Se observó que a MOI 5 ufp/cel hubo una menor oxidación (Fig.2) y mayor producción de la proteína roGFP2 (dato no mostrado). A medida que disminuyó la MOI, el ambiente redox fue más oxidante mientras que la producción de proteína recombinante disminuyó. El cambio de potencial fue obtenido a través de la ecuación de Nernst (dato no mostrado).

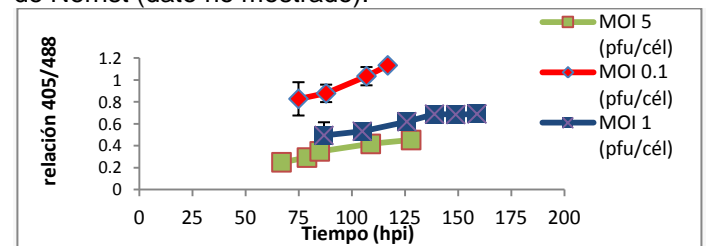


Fig 2. Relación de la intensidad de fluorescencia de roGFP excitando a 405/ 488 nm.

Conclusiones. Los cultivos infectados a una MOI de 5 ufp/cél tuvieron un ambiente intracelular menos oxidado y una mayor producción de proteína. Esta información es de gran utilidad para establecer estrategias de producción que disminuyan los efectos adversos obtenidos sobre las proteínas con uso terapéutico humano.

Agradecimientos PAPIIT UNAM/ T2001/3, IT 21214eIT200315, Apoyo técnico: Vanessa Hernández, Rosa Román, y Ruth Pastor.

Bibliografía.

- Schwarz, K. B. (1996). Oxidative stress during viral infection: a review. *Free Radical Biology and Medicine*, 21(5), 641-649.
- Cannon, M. B., & Remington, S. J. (2006). Re-engineering redox-sensitive green fluorescent protein for improved response rate. *Protein science*, 15(1), 45-57.