



PRODUCCIÓN DE PSEUDO-PARTÍCULAS DE ROTAVIRUS DE TRIPLE CAPA

Ricardo Castro, Octavio Tonatiuh Ramírez, Laura A. Palomares.

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001 Col. Chamilpa Cuernavaca Morelos C.P. 62210, Fax: (777)-3138811, laura@ibt.unam.mx

Palabras clave: pseudo-partículas de rotavirus (PPR), sistema de células de insecto baculovirus (SC-BV), multiplicidad de infección (MDI), Vacunas recombinante.

Introducción. Rotavirus es la principal causa de muertes por diarrea en niños menores de 5 años (1). Este virus está compuesto por 4 proteínas estructurales, VP2, VP4, VP6 y VP7 que conforman las 3 capas características de la cápside. Las pseudo-partículas de rotavirus (PPR) están formadas por las proteínas estructurales, pero no contienen el material genético del virus. De tal forma, las PPR tienen gran importancia como vacunas, ya que son capaces de generar una buena respuesta inmune, pero sin el riesgo asociado a un virus atenuado o inactivado (2). Durante de la producción de PPR en el sistema de células de insecto-baculovirus (SC-BV) se obtienen diferentes intermediarios (PPR de doble y triple capa), que son difíciles de identificar, lo cual es necesario para el desarrollo de un sistema adecuado de cuantificación y optimización de la producción de cápsides completas (3,4). En este trabajo se desarrollaron estrategias para diferenciar entre las partículas de doble capa y las de triple capa de rotavirus para optimizar su producción.

Metodología. La producción de PPR se realizó infectando células de insecto High Five® con 3 baculovirus que codifican para las proteínas VP2, VP6 y VP7. Esta infección se llevó a cabo en un matraz de 250 mL (volumen de operación de 60 mL) a una concentración celular de 0.5×10^6 cel/mL y una MDI de 1 ufp/cel de cada baculovirus. La purificación parcial de las PPR se realizó mediante gradientes de CsCl, ultracentrifugando a 35,000 rpm durante 18 h a 4 °C. Las PPR purificadas se analizaron mediante HPLC utilizando columnas de exclusión molecular, geles desnaturalizantes de poliacrilamida, Western blot, electroforesis capilar de isoelectroenfoque y microscopía electrónica.

Resumen y discusión. La cromatografía de exclusión molecular permitió diferenciar entre PPR de doble y triple capa (Fig. 1). Se realizaron cinéticas de producción de PPR con las cuales se determinaron las velocidades de producción de estas estructuras, así como el comportamiento del cultivo a lo largo de la infección. Se implementó el uso de calcio en el tratamiento de las muestras debido a las características de las PPR de triple y doble capa, ya que las partículas de doble capa se desensamblan al ser expuestas a una concentración de calcio por arriba de 5 mM, mientras que las de triple capa requieren calcio para su estabilidad. Se realizaron cinéticas de producción en las cuales se analizó el calcio intracelular y extracelular durante la infección, con el fin de determinar si el ensamblaje de las PPR de triple capa se realiza completamente

dentro de la célula o es dependiente de los tratamientos posteriores.

Se implementó la electroforesis capilar de isoelectroenfoque, una metodología alterna que permitió también diferenciar las PPR de doble y triple capa y seguir la producción de estas partículas. Se analizaron las PPR de triple capa mediante microscopía electrónica con tinción con uranilo, con lo que se confirmó la presencia de PPR en la muestra.

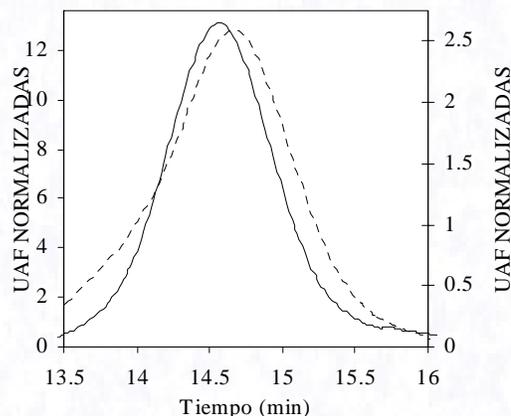


Fig.1. Cromatograma de las PPR semipurificadas. La línea continua es PPR de triple capa, la cual eluye a 14.58 minutos. La línea discontinua es PPR de doble capa, la cual eluye 14.68 minutos.

Conclusiones. El manejo de las diferentes características de las PPR es una herramienta factible para el desarrollo de una metodología que nos permita utilizar cromatografía de exclusión molecular y electroforesis capilar para monitorear la producción de PPR y así optimizar el proceso.

Agradecimientos. CONACYT-SAGARPA 2004-C01-103, PAPIIT-UNAM 223805 y 206407.

Bibliografía.

1. Parashar U.D., *et al.* (2006). Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerging Infections Diseases*. 12: 304-306.
2. Blutt S.E., *et al.* (2005). Host, viral, and vaccine factors that determine protective efficacy induced by rotavirus and virus-like particles (VLPs).
3. Crawford S.E., *et al.* (1994). Characterization of virus-like particles produced by the expression of rotavirus capsid proteins in insect cells. *J. Virol.* 68: 5945-5952.
4. Palomares L.A., *et al.* (2002). Strategies for manipulating the relative concentration of recombinant rotavirus structural proteins during simultaneous production by insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* 78: 635-644.