



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



ESTUDIO DEL EFECTO DE LA TEMPERATURA Y EL pH SOBRE LA ESTRUCTURA DE PARTICULAS PSEUDOVIRALES DE VIRUS ADENOSOCIADO.

Cuitláhuac Chávez Peña, Octavio Tonatiuh Ramírez, Laura A. Palomares
Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México Av. Universidad 2001, Col. Chamilpa C.P.
62210, Cuernavaca, Morelos

Fax: (777) 3138811. E-mail: cuitlac@ibt.unam.mx , laura@ibt.unam.mx

Palabras clave: virus adenoasociado, tamaño de partícula, estabilidad, pH, temperatura

Introducción. Las partículas pseudovirales (PPV) son macroestructuras formadas a partir de las proteínas de la cápside de un agente viral pero que carecen de material genético. Las PPV derivadas del virus adenoasociado (VAA) son una herramienta importante en el diseño de vectores para terapia génica (1). Además, sus características abren la posibilidad de utilizarlas para otras aplicaciones nanobiotecnológicas. La preparación y formulación de PPV para fines terapéuticos o de diagnóstico requiere su exposición a diversas condiciones fisicoquímicas, lo que puede ocasionar cambios morfológicos o conformacionales de las partículas y las proteínas que las forman, dando como resultado la aparición de nuevas macroestructuras (2,3) o la degradación de la partícula. En este trabajo se evaluó el efecto de la temperatura y el pH sobre la estructura de las PPV-VAA, en búsqueda de la aparición de cambios conformacionales y la identificación de un intervalo de pH y temperatura en los que las PPV mantengan su estructura característica. Se pretende que la información aportada por este estudio sea útil para el establecimiento de un perfil de estabilidad y la definición de condiciones de almacenamiento apropiadas para las PPV-VAA.

Metodología. Las PPV-VAA se produjeron en el sistema células de insecto-baculovirus y fueron purificadas mediante intercambio iónico y gradientes isopícnicos en iodixanol. El diámetro hidrodinámico (D_H) de las PPV y la formación de agregados tras la exposición a diferentes temperaturas y valores de pH, se midió mediante dispersión dinámica de luz (DLS). La integridad de la PPV-VAA se verificó mediante microscopía electrónica (TEM) e inmunodetección.

Resultados. A 25°C se detectó una población con un D_H de 26nm (tamaño similar al del VAA). El tamaño de esta población permaneció constante, hasta los 59°C. Al elevar la temperatura a 61°C, se presentó un incremento de 2nm en el D_H , producto de un cambio conformacional que provocó el movimiento de un dominio peptídico del interior de la PPV hacia el exterior (confirmado mediante inmunodetección). A partir de 63°C no fue posible detectar partículas de D_H similar al de VAA ni se obtuvo señal positiva en los ensayos de inmunodetección. El índice de agregación de la muestra (partículas con $D_H > 40\text{nm}$ /partículas totales) permaneció constante (0.16) desde los 25 hasta los 61°C. A partir de los 63°C, el índice de agregación aumentó, alcanzando un valor de 1 al llegar a los 65°C. (Figura 1). Producto de la disminución del pH en el rango evaluado, se observó un decremento en el D_H de las PPV-VAA, mas no en el tamaño medido a partir de las micrografías electrónicas. Además se apreció una

disminución en el contenido de partículas con $D_H < 40\text{nm}$ que representa a las PPV-VAA no agregadas (Figura 2)

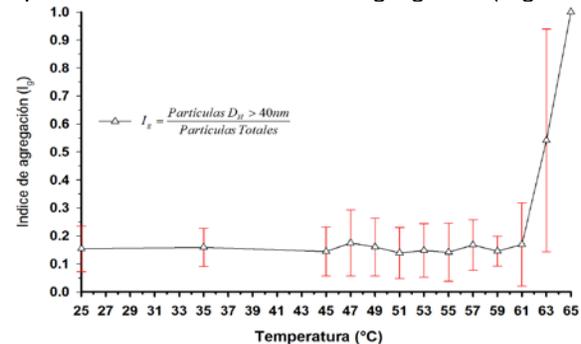


Fig. 1. Índice de agregación de muestras con PPV-VAA incubadas a diferentes temperaturas. Se presentan las medias y desviaciones estándar de triplicados del experimento.

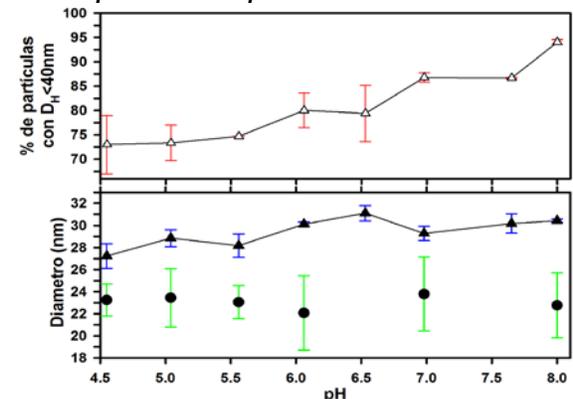


Fig. 2. Diámetro hidrodinámico (Δ), diámetro determinado mediante TEM (\bullet) y contenido relativo (Δ) de PPV-VAA en muestras expuestas a diferentes condiciones de pH

Conclusiones. Se identificó, la temperatura crítica que ocasiona la pérdida de la estructura característica de las PPV-VAA (61°C), al igual que el tiempo máximo de exposición a la mencionada temperatura (30 minutos), antes de que se presente la agregación de las PPV. La disminución del pH de las soluciones con PPV-VAA ocasionó cambios en el diámetro hidrodinámico que parecen ser consecuencia de la separación de agrupaciones de 2 ó 3 cápside y no a cambios en el tamaño de las cápsides. Las PPV-VAA parecen ser estables en el intervalo de pH evaluado.

Agradecimientos. PAPIIT-UNAM IN223210, IN224409, SEP CONACYT 101847

Bibliografía.

1. Mueller, C., Flotte, T.R. (2008). *Gene therapy*. **15**, 858-63
2. Liu, H. (2003). *Journal of Structural Biology*. **142**, 356-363
3. Lepault, J. et al. (2001). *The EMBO journal* **20**, 1498-507