



# XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



## LA DISTRIBUCIÓN INTRACELULAR DE LAS PROTEÍNAS DE VIRUS ADENO-ASOCIADO TIPO 2 NO LIMITA SU PRODUCCIÓN EN CÉLULAS DE INSECTO

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: [laura@ibt.unam.mx](mailto:laura@ibt.unam.mx), [liligr@ibt.unam.mx](mailto:liligr@ibt.unam.mx)

*Palabras clave:* Virus adeno-asociado tipo 2 (VAA-2), vector para terapia génica, localización intracelular.

**Introducción.** El sistema de células de insecto-baculovirus (SCI-BV) permite la producción de vectores de virus adeno-asociado (vVAA) para terapia génica a mayor escala y menor costo que en células de mamífero. El SCI-BV emplea baculovirus para expresar los componentes de VAA-2 tales como: proteínas de cápside (VPs), el genoma del vector (GVAA), y proteínas no estructurales, llamadas Rep, que participan en la replicación (Rep78) y el empaquetamiento (Rep52) del genoma [1]. Los rendimientos de partículas transductoras en el SCI-BV son comparables a los de células de mamífero pero la relación cápsides totales/cápsides llenas es 10 veces mayor en el SCI-BV [2]. Esto sugiere limitaciones en la producción de GVAA o su empaquetamiento. Para el correcto ensamblaje del vector, todos los componentes deben expresarse e interactuar al interior de la célula. El SCI-BV ofrece un ambiente intracelular distinto al de células de mamífero, por lo que se desconocía si la interacción de los componentes de VAA podría verse afectada. En este trabajo se evaluó la localización intracelular de los componentes de VAA en células de insecto para determinar si ésta constituye una limitación durante la producción del vector.

**Metodología.** Mediante inmunofluorescencia se evaluó la localización intracelular de las proteínas VP y Rep de VAA en expresión individual o en co-expresión en células H5 [3]. Adicionalmente, se analizó el sitio de acumulación de cápsides de VAA mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM).

**Resultados y discusión.** La proteína VP se ensambla en compartimentos específicos dentro del núcleo. No se determinó si dichos compartimentos corresponden a nucléolo como ocurre en células de mamífero. Rep52 se localizó en todo el núcleo durante su expresión individual, en co-expresión con VP y en presencia de los GVAA. La concentración de Rep78 disminuyó considerablemente tras 48 h de infección cuando se expresó individualmente (fig. 1), pero se mantuvo estable en co-expresión con VP y en presencia de los GVAA, además de modificar su distribución intracelular (fig. 2). Durante la co-expresión de todos los componentes de VAA-2 se observó que las cápsides se acumularon preferentemente en la periferia nuclear. Mediante microscopía electrónica se observaron cápsides en vesículas localizadas alrededor del estroma virogénico que genera el baculovirus (fig. 3).

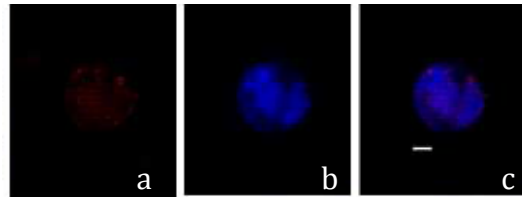


Fig. 1. Inmunofluorescencia de células H5 infectadas para expresión de Rep78. a) Rep78, b) núcleo, c) sobrelape de a y b.

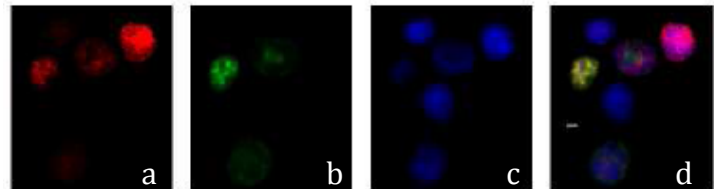


Fig. 2. Inmunofluorescencia de células H5 coinfectadas para expresión de VP y Rep78. a) Rep78, b) VP, c) núcleos, d) sobrelape de a, b y c.

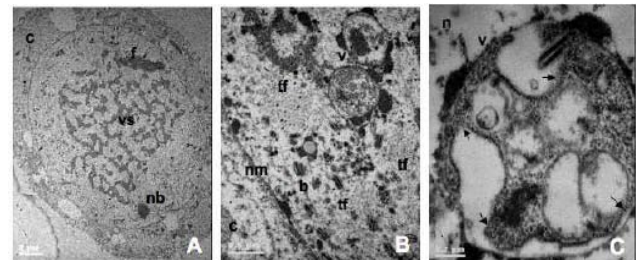


Fig. 3. TEM de células H5 infectadas. a) núcleo celular, b) vesículas en periferia nuclear, c) cápsides dentro de vesícula.

**Conclusiones.** La diferencia en distribución intracelular de cápsides y de Rep78 en expresión individual y en presencia de otros componentes de VAA indican que existen interacciones en el interior de las células de insecto. La localización intracelular no representa una limitación para la producción del vector [3].

**Agradecimientos.** PAPIIT-UNAM IN224409 e IN223210, y SEP-CONACyT 2008-01-101847. Apoyo técnico de A. R Pastor, V. Hernández y G. Zavala. Unidad de microscopía electrónica IBT-UNAM.

### Bibliografía.

- Urabe, M. et al. (2002) Insect cells as a factory to produce adeno-associated virus type-2 vectors. *Hum. Gene Ther.* 13: 1935-1943.
- Aucoin M. G. et al. (2007) Critical assessment of current adeno-associated viral vector production and quantification methods. *Biotech. Adv.* 26 (1): 73-88
- Gallo-Ramírez et al. (2011) Intracellular distribution of adeno-associated viral proteins expressed in insect cells. *Biotech. Prog.* (En prensa).