



**UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO**

**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**

**ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE EXPRESIÓN BAC TO BAC PARA  
LA GENERACIÓN DE PROTEÍNAS INMUNOGÉNICAS DE LA FIEBRE  
AFTOSA**

**Ana Claudia Samaniego Villacís**

**Paulina Andrade, MsC., Director de Tesis**

Tesis de grado presentada como requisito  
para la obtención del título de Ingeniera en Procesos Biotecnológicos

Quito, mayo de 2015

**Universidad San Francisco de Quito**  
**Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales**  
**HOJA DE APROBACION DE TESIS**

**Establecimiento del sistema de expresión Bac to Bac para la generación de proteínas  
inmunogénicas de la fiebre aftosa**

**Ana Claudia Samaniego Villacís**

Paulina Andrade, Ms.C.,  
Director de Tesis y Miembro del Tribunal .....

Venancio Arahana, Ph.D.,  
Miembro del Comité de Tesis .....

María de Lourdes Torres, Ph.D.,  
Miembro del Comité de Tesis .....

Stella de la Torre, Ph. D.,  
Decano del Colegio de  
Ciencias Biológicas y Ambientales .....

Quito, mayo de 2015

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído la Política de Propiedad Intelectual de la Universidad San Francisco de Quito y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo de investigación quedan sujetos a lo dispuesto en la Política.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo de investigación en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma:

-----

Nombre: Ana Claudia Samaniego Villacís

C. I.: 1104338668

Lugar y fecha: Quito, mayo 2015

**DEDICATORIA:**

Dedico este trabajo a mis padres y hermanos que son el mayor soporte y aliento en mi vida personal y académica. El trabajo aquí plasmado es el fruto de una ardua labor que sin su apoyo constante no habría sido posible. Este trabajo es para ellos, con mucho amor y gratitud.

**AGRADECIMIENTOS:**

Este trabajo reúne el compromiso y la colaboración de muchas personas que fueron muy importantes para su culminación.

Primero, mi mayor agradecimiento a mi directora de tesis Paulina Andrade, quien en todo este tiempo ha sabido ser una excelente mentora, guía y amiga; y quien además ha logrado explotar al máximo las capacidades y destrezas que ha encontrado en mí. Le agradezco la oportunidad de haberme permitido trabajar con ella, la confianza en mí puesta y todo el tiempo y energía invertidos en mi superación académica.

También quiero agradecer a dos personas que pusieron su tiempo a mi disposición para dejarme aprender de su experiencia y conocimiento: Julio Carrera y Dámaris Intriago. Los dos han sido personas fundamentales en el desarrollo de mi tesis quienes muchas veces dejaron sus labores para ayudarme y enseñarme, siempre con la mejor predisposición.

Agradezco también a Cristina Chávez y Gabriela Vasco quienes me permitieron la utilización de las facilidades del Instituto de Microbiología y que me instruyeron en el uso de las mismas además de estar siempre prestas a ayudarme en los procedimientos necesarios. Además al laboratorio de Biotecnología de Plantas de la USFQ.

Gracias a todos los profesores y profesoras que fueron fuente de conocimiento y de inspiración en el recorrido de esta carrera y cuyos consejos, sugerencias y correcciones me llevan siempre a ser una persona más íntegra y a una profesional con mejor criterio y capacidad de discernimiento. Gracias por su tiempo, dedicación y entrega.

Quiero hacer una referencia muy especial a todos mis compañeros “biotecs” con quienes he compartido durante estos cinco años logros y fracasos, siempre juntos apoyándonos unos a otros. Les agradezco infinitamente el haber sido siempre un andamio hacia mis metas, una enorme compañía en el camino a este logro y ese toque de alegría y risas en cada día.

A todas las personas que no menciono pero que estuvieron formando parte de mi vida durante esta etapa tan importante y que a pesar de las adversidades se mantuvieron siempre a mi lado, muchísimas gracias.

## RESUMEN

La producción de proteínas mediante sistemas de expresión es un campo que cada vez toma más fuerza en la industria biotecnológica. La expresión de proteínas que puedan ser usadas como biofármacos o como tratamientos para enfermedades es una de las aplicaciones más trascendentales de la expresión de proteínas heterólogas. También la expresión de proteínas inmunogénicas de origen bacteriano o viral que puedan funcionar como subunidades de vacuna contra enfermedades es una aplicación muy significativa en este campo. Este es el caso de la fiebre aftosa, que es la enfermedad de ganado más importante desde el punto de vista económico, debido a su alto riesgo de contagio, tratamientos profilácticos difíciles de administrar, endemidad en países ganaderos e imposibilidad de tratamiento. Esta enfermedad causa pérdidas económicas muy altas en países de todo el mundo, incluido el Ecuador.

El presente trabajo consistió en el establecimiento de un sistema Bac-to-Bac para la expresión de la proteína inmunogénica VP1 de la cápside del virus de la fiebre aftosa. Se estableció el cultivo de células de insecto Sf9 y se logró exitosamente la transfección y la infección de estas células, con las partículas virales obtenidas. Además se estableció un método de detección de proteínas en acrilamida mediante tinción con nitrato de plata. La expresión de la proteína VP1 no se pudo determinar con éxito por lo que se requiere trabajos posteriores para llegar a la expresión confirmada de esta proteína en las células Sf9 e identificación de la misma.

## ABSTRACT

The production of proteins in biological expression systems is a promisory field in the biotechnological industry. The production of immunogenic proteins that could be used as vaccine subunits for the profilactic treatment of bacterial or viral diseases is a significant application. This is the case of foot and mouth disease (FMD) wich is the most important cattle afection, from the economical point of view. This disease causes enormous economical loses due to its high risk of contagion, the difficulties in the administration of traditional vaccines and the imposibility of treatment.

The present work consisted in the stablishment of a Bac-to-Bac system for the expression of the immunogenic protein VP1 of the foot and mouth disease virus (FMDV). The cell culture was succesfully stablished and also the protocols for transfecting and infecting Sf9 cells. Furthermore, a protocol for detection of proteins in polyacrilamide gels with AgNO<sub>3</sub> was stablished.

The expression of VP1 protein could not be determined, that's why, further research needs to be done to express the VP1 protein in SF9 cells and identify the protein.



**TABLA DE CONTENIDO:**

1. INTRODUCCIÓN.....	14
1.1. Antecedentes .....	14
1.2. Sistemas de expresión de proteínas heterólogas.....	14
1.2.1. <i>Escherichia coli</i> .....	14
1.2.2. Levaduras .....	15
1.2.3. Células de mamífero .....	15
1.2.4. Células de insecto .....	16
1.3. Importancia de la producción de proteínas heterólogas .....	16
1.3.1. Aplicación de las proteínas heterólogas en la investigación .....	16
1.3.2. Producción de biofármacos.....	16
1.4. Fiebre aftosa .....	17
1.4.1. Estructura molecular .....	17
1.4.2. Enfermedad de la Fiebre Aftosa .....	17
1.4.3. Impacto de la enfermedad de la fiebre aftosa en el Ecuador y el mundo ...	18
1.5. Prevención de la fiebre aftosa, sus problemas y posibles alternativas .....	18
1.5.1. Prevención con vacunas tradicionales .....	18
1.5.2. Problemas en la producción y manejo de las vacunas tradicionales.....	18
1.5.3. Subunidades de vacunas como una alternativa para las vacunas tradicionales .....	19
1.6. Utilización del sistema de expresión Bac-to-Bac para la producción de proteínas inmunogénicas de la fiebre aftosa que pueden ser utilizadas como posibles candidatos de subunidades de vacuna .....	20
1.6.1. Ventajas sobre otros sistemas .....	20
1.6.2. Creación del vector bacmid a partir de un baculovirus.....	21
1.6.3. Expresión de proteínas inmunogénicas de la fiebre aftosa .....	21
2. OBJETIVOS.....	23
3. JUSTIFICACIÓN.....	24
4. ÁREA DE ESTUDIO.....	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
5.1. Materiales .....	26
5.1.1. Establecimiento del cultivo celular .....	26
5.1.1.1. Medio para el cultivo de células Sf9 .....	26

5.1.1.2.	Mantenimiento de las células Sf9 .....	26
5.1.1.3.	Creación de un stock de células Sf9.....	26
5.1.2.	Establecimiento del Sistema Bac to Bac.....	26
5.1.2.1.	Transfección de las células Sf9 con el bacmid recombinante.....	26
5.1.2.2.	Análisis de la transfección por PCR.....	27
5.1.2.2.1.	Preparación de las Muestras para el PCR.....	27
5.1.2.2.2.	Preparación del Master Mix .....	27
5.1.2.2.3.	Gel de Agarosa .....	27
5.1.2.2.4.	Buffer de Corrida.....	28
5.1.2.2.5.	Preparación para cargar las muestras .....	28
5.1.3.	Análisis de la expresión de proteínas recombinantes .....	28
5.1.3.1.	Recolección del sobrenadante de las células Sf9 transfectadas con el bacmid recombinante.....	28
5.1.3.2.	Recolección de las células Sf9 transfectadas con el bacmid recombinante.....	28
5.1.3.3.	Amplificación del virus con el sobrenadante de la transfección de las células Sf9 con el bacmid recombinante .....	28
5.1.3.4.	Análisis mediante una electroforesis de proteínas SDS-PAGE.....	29
5.1.3.4.1.	Preparación de las muestras .....	29
5.1.3.4.2.	Preparación del gel de poliacrilamida .....	29
5.1.3.4.3.	Electroforesis de proteínas .....	29
5.1.3.4.4.	Tinción del gel con nitrato de plata.....	29
5.2.	Métodos.....	30
5.2.1.	Establecimiento del cultivo celular.....	30
5.2.1.1.	Medio para el cultivo de las células Sf9.....	30
5.2.1.2.	Mantenimiento de las células Sf9 .....	30
5.2.1.3.	Mantenimiento de un stock de células Sf9.....	30
5.2.2.	Establecimiento del Sistema Bac-to-Bac .....	31
5.2.2.1.	Transfección de las células Sf9 .....	31
5.2.2.2.	Análisis de la transfección por PCR.....	32
5.2.2.2.1.	Recolección de sobrenadante y células transfectadas .....	32
5.2.2.2.2.	Lisis de las células para el análisis del ADN.....	32
5.2.2.2.3.	Preparación del Master Mix .....	32

5.2.2.2.4.	Gel de Agarosa .....	32
5.2.2.2.5.	Buffer de Corrida.....	33
5.2.2.2.6.	Electroforesis en agarosa.....	33
5.2.3.	Infección de células Sf9 con el bacmid recombinante.....	33
5.2.3.1.	Amplificación del virus recombinante obtenido en la transfección.	33
5.2.3.2.	Infección de células Sf9 con el virus amplificado .....	33
5.2.3.3.	Recolección de células y sobrenadantes de la infección.....	34
5.2.4.	Análisis mediante una electroforesis de proteínas SDS-PAGE.....	34
5.2.4.1.	Preparación de las muestras .....	34
5.2.4.2.	Preparación del gel de poliacrilamida .....	34
5.2.4.3.	Electroforesis de proteínas .....	34
5.2.4.4.	Tinción del gel con nitrato de plata.....	35
6.	RESULTADOS .....	36
6.1.	Establecimiento del cultivo celular de Sf9 .....	36
6.2.	Establecimiento del Sistema bac to bac .....	36
6.2.1.	Aislamiento del bacmid a partir de las bacterias competentes E. Coli DH10Bac™ .....	36
6.2.2.	Transfección de las células Sf9 .....	37
6.3.	Infección de células Sf9 con el virus amplificado.....	37
6.4.	Análisis de la expresión de la proteína VP1 mediante una electroforesis SDS- PAGE.....	37
7.	DISCUSIÓN .....	39
8.	CONCLUSIONES.....	45
9.	RECOMENDACIONES .....	46
10.	BIBLIOGRAFÍA .....	47
11.	TABLAS.....	50
12.	FIGURAS .....	51
13.	ANEXOS .....	56

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Cálculo de la cantidad de FectoFly a usar para la transfección .....	50
<b>Tabla 2:</b> Preparación del master mix para amplificación por PCR de VP1 .....	50
<b>Tabla 3:</b> Condiciones para la amplificación por PCR de VP1 .....	50

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> a. Flask T-25 para el crecimiento de las células Sf9 con 4ml de medio de cultivo. b. Células Sf9 crecidas en monocapa.....	51
<b>Figura 2:</b> Células Sf9 que han alcanzado el 100% de confluencia en el crecimiento en monocapa .....	51
<b>Figura 3:</b> Extracción de bacmid y verificación de la presencia de VP1.....	51
<b>Figura 4:</b> PCR confirmatorio de la inserción de VP1 en el lugar correcto del bacmid .....	52
<b>Figura 5:</b> Comparación morfológica de las células transfectadas VS las no transfectadas. a. Células transfectadas 48h post-transfección. b. Mock- control negativo: Células no transfectadas 48h. ....	52
<b>Figura 6:</b> Comparación morfológica de células infectadas. Células Sf9 infectadas luego de: a. 24 horas, b. 48 horas, c. 72 horas y d. 96 horas. ....	52
<b>Figura 7:</b> PCR de VP1 en muestras de células y sobrenadantes. Orden de carga de pocillos de izquierda aderecha: 1) Ladder 100pb Invitrogen, 2) Control positivo, 3) Control negativo, 4) Mock células, 5) Células luego de 24h de infección, 6) Células luego de 48h de infección, 7) Células luego de 72h de infección, 8) Células luego de 96h de infección, 9) Mock sobrenadante, 10) Sobrenadante luego de 24h de infección, 11) Sobrenadante luego de 48h de infección, 12) Sobrenadante luego de 72h de infección, 13) Sobrenadante luego de 96h de infección. ....	53
<b>Figura 8:</b> SDS-PAGE de células cultivadas en medio SF-9000 con FBS, con tinción de azul de coomasie. Muestras de los pocillos de izquierda a derecha: 1) Benchmarck protein ladder (7ul), 2) Células MOCK, 3) Células 24 horas postinfección, 4) Células 48 horas postinfección, 5) Células 72 horas postinfección, 6) Células t 96 horas postinfección..	53
<b>Figura 9:</b> SDS-PAGE de células cultivadas en medio SF-9000 con FBS con tinción de nitrato de plata. Muestras de los pocillos de izquierda a derecha: 1) Benchmarck protein ladder (7ul), 2) Células MOCK, 3) Células 48 horas postinfección, 4) Células 72 horas postinfección, 5) Células 96 horas postinfección, 6) Sobrenadante 48h post transfección, 7) Sobrenadante 72h post transfección, 8) Sobrenadante 96h post transfección.....	54

**Figura 10:** SDS-PAGE de células cultivadas en medio ESF-921 sin proteínas, con tinción de nitrato de plata. Muestras de los pocillos de izquierda a derecha: 1) Benchmarck protein ladder (7ul), 2) Células MOCK, 3) Células 24 horas postinfección, 4) Células 48 horas postinfección, 5) Células 72 horas postinfección, 6) Células 96 horas postinfección.... 54

**Figura 11:** SDS-PAGE de sobrenadantes con tinción de nitrato de plata. Muestras de los pocillos de izquierda a derecha: 1) Benchmarck protein ladder (7ul), 2) Sobrenadante MOCK, 3) Sobrenadante 24 horas postinfección, 4) Sobrenadante 48 horas postinfección, 5) Sobrenadante 72 horas postinfección, 6) Sobrenadante 96 horas postinfección. .... 55

### TABLA DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Anticuerpos de origen recombinante que se producen en la actualidad.....	56
<b>Anexo 2:</b> Estructura molecular del virus de la fiebre aftosa .....	57
<b>Anexo 3:</b> Situación de la fiebre aftosa en Sudamérica hasta mayo de 2012. ....	57
<b>Anexo 4:</b> Diagrama de preparación de la solución de transfección con FectoFly. ....	58
<b>Anexo 5:</b> Secuencia de los primers M13.....	58
<b>Anexo 6:</b> Segmento amplificado con los primers M13.....	58
<b>Anexo 7:</b> Diagrama de ingreso de ADN foráneo en una célula mediante lipofección .....	59
<b>Anexo 8:</b> Diagrama de preparación de FectoFly y ADN para la transfección celular.....	59

## **1. INTRODUCCIÓN**

### **1.1. Antecedentes**

La demanda de proteínas en mayores cantidades y menores tiempos por parte de las industrias médicas, farmacológicas, alimenticias, entre otras, ha obligado al desarrollo de métodos de producción de proteínas rápidos y eficientes. Industrialmente, se produce proteínas de un determinado organismo en sistemas biológicos más sencillos, que los organismos multicelulares, como bacterias, levaduras y también líneas celulares de distintos orígenes. Estos sistemas biológicos permiten la expresión, es decir permiten el proceso de traducción de la información codificada en los ácidos nucleicos, ADN y ARN, a proteínas (Cultek, 2015), incluyendo el ADN foráneo que se pueda insertar en el sistema. Las proteínas resultantes o proteínas heterólogas (de distinto origen) pueden ser utilizadas en muchos campos de investigación y de hecho, algunas de estas son producidas en enormes cantidades en la actualidad. Algunos ejemplos son: insulina, factores de crecimiento, heparina, albúminas, antígenos de virus, enzimas útiles en industrias papeleras, textiles y alimenticias, entre muchas otras (Guevara Hernandez, et. al., 2013).

La producción de proteínas recombinantes también ha abierto la puerta a una aplicación importante en el campo de la salud humana y animal, que es la producción de proteínas inmunogénicas. Estas proteínas posteriormente pueden ser utilizadas para el desarrollo de candidatos a subunidades de vacunas. Muchas enfermedades causadas por virus carecen de tratamientos profilácticos, eficientes, seguros y a la vez rentables. Un ejemplo de estas es la fiebre aftosa, la cual afecta al ganado y es un problema constante en países que dependen económicamente de esta actividad, como es el caso del Ecuador. Por lo tanto, el establecimiento de un sistema de expresión que permita la producción de proteínas recombinantes con aplicaciones para el desarrollo de vacunas de subunidades para esta enfermedad, puede ser una alternativa interesante para el estudio y producción de métodos profilácticos más eficientes.

### **1.2. Sistemas de expresión de proteínas heterólogas**

#### **1.2.1. *Escherichia coli***

La expresión de proteínas en sistemas bacterianos, principalmente *E. coli*, tiene un costo de producción bajo en un tiempo muy corto, lo cual beneficia a la industria. La bacteria *Escherichia coli*, es probablemente la más estudiada y conocida, por lo que es ampliamente usada en el campo de la ingeniería genética. Para expresar una proteína, se requiere un vector

que lleve un origen de replicación bacteriano, un marcador de selección, un promotor bacteriano, el gen terminador y la secuencia del gen de interés (Drago y Sainz, 2006).

A pesar de sus beneficios, la utilización de *E. coli* como hospedera implica que la proteína producida no tendrá modificaciones postraduccionales propias de las células eucarióticas. Por ejemplo la glicosilación que en general son necesarias para la actividad biológica y la estabilidad de la proteína (Drago y Sainz, 2006).

### **1.2.2. Levaduras**

Las levaduras son utilizadas como el sistema eucariótico más sencillo de expresión de proteínas. Las especies más utilizadas a nivel industrial son *Pichia pastoris* y *Saccharomyces cerevisiae* (Drago y Sainz, 2006).

En el caso de las levaduras, también se utiliza vectores que permitan la introducción del gen de interés a la célula. La expresión de proteínas en levaduras es bastante usada en la industria farmacéutica puesto que tiene algunas ventajas. Por ejemplo, no se necesita extraer endotoxinas para el proceso de purificación de la proteína final, lo que sí es necesario cuando se trabaja con sistemas bacterianos (Wildt y Gerngross, 2005).

En cuanto a las modificaciones postraduccionales, a pesar de que la glicosilación sí se da en las levaduras, la composición de los azúcares de las glicoproteínas resultantes difiere de la proteína nativa de origen animal o humano. Las proteínas glicosiladas de las levaduras tienden a tener una vida media menor, aunque actualmente se está trabajando en la modificación de la glicosilación en levaduras y en la expresión de glicoproteínas terapéuticas con estructuras N-glicosiladas humanizadas (Wildt y Gerngross, 2005).

### **1.2.3. Células de mamífero**

Los sistemas de expresión de proteínas heterólogas en células de mamíferos son cada vez más utilizados, pese a su alto costo. Esto se debe a que son capaces de producir plegamientos, modificaciones postraduccionales y ensamblajes correctos del producto, lo que es muy importante para asegurar una buena actividad biológica de la proteína recombinante de interés. Entre las especies más comunes de las líneas celulares están: ratones, monos y humanos (Kishwar, 2013).

Uno de los problemas más importantes del trabajo con células de mamífero es la posibilidad de contaminaciones con virus animales. Esto hace que el trabajo sea más peligroso para los operadores que al usar líneas celulares de otras especies. Asimismo, los virus humanos pueden contaminar los cultivos celulares de células de mamíferos con mayor facilidad que

los de insecto o los de organismos unicelulares. Otro inconveniente del trabajo con células de mamífero es la complejidad y el costo de su mantenimiento (Kishwar, 2013).

#### **1.2.4. Células de insecto**

Líneas celulares continuas de células de insecto fueron por primera vez desarrolladas en 1962, a partir del tejido del ovario de una polilla de la especie *Antherea eucalypti*. En la actualidad existen más de 400 líneas celulares de más de 100 especies diferentes de insectos (Lynn, 1996).

Las células de insecto tienen algunas ventajas sobre otras líneas celulares ya que su manejo es más sencillo, tienen mayor resistencia, estabilidad y tolerancia a la osmolaridad y su producción es mayor con una menor concentración de células (Ikonomou, 2003).

Las células de insecto han demostrado la capacidad de producir proteínas complejas con una glicosilación altamente similar a la de las proteínas humanas, muy superior a la que se puede conseguir con sistemas de expresión en levaduras (Rendic, et. al., 2007).

Otra gran ventaja de las células de insecto, al compararlas con otros sistemas de expresión como las células de mamífero, es su bajo riesgo dentro del manejo de laboratorio ya las líneas no corren el riesgo de contaminarse con patógenos humanos (Rendic, et. al., 2007).

### **1.3. Importancia de la producción de proteínas heterólogas**

#### **1.3.1. Aplicación de las proteínas heterólogas en la investigación**

Las proteínas heterólogas son utilizadas en el ámbito de la investigación para determinar rutas metabólicas en organismos y para entender la importancia de una proteína o de la falta de esta. La producción de proteínas también ha servido para entender el papel de las proteínas chaperonas en el plegamiento de una proteína. Además, se ha estudiado las distintas formas de plegamiento que puede adoptar una proteína y relacionarlas con la actividad biológica que presenta la proteína en cuestión (Wells, et. al., 1993).

Además, las proteínas recombinantes pueden ser utilizadas como herramientas de diagnóstico, como proteínas terapéuticas o como enzimas funcionales. Muchas de las proteínas heterólogas que se producen en cantidades industriales son anticuerpos (Anexo 1).

#### **1.3.2. Producción de biofármacos**

Los biofármacos son fármacos (proteínas, hormonas, enzimas) producidos por organismos genéticamente modificados (Jayaraj y Smooker, 2009). La ventaja enorme de estas proteínas recombinantes es que son idénticas o difieren muy poco de las proteínas nativas de origen humano por lo que las reacciones inmunológicas adversas disminuyen significativamente (Sodoyer, 2004).



Antes de la producción de biofármacos, las proteínas necesarias para tratar enfermedades causadas por deficiencias en la producción normal de las mismas, debían obtenerse de fuentes animales. Esto conllevaba problemas en la actividad biológica de las proteínas, puesto que provenían de especies diferentes; y además causaban reacciones de rechazo en el organismo receptor (Sodoyer, 2004).

Más de 150 biofarmacéuticos de uso humano y de uso veterinario han sido aprobados para su uso y comercio en el mercado de Estados Unidos y Europa (Walsh, 2005).

## **1.4. Fiebre aftosa**

### **1.4.1. Estructura molecular**

El virus de la fiebre aftosa (FA) pertenece a la familia de los *Picornavirus* del género *Aphthovirus*. Es un virus de cadena simple de ARN de sentido positivo. El genoma del virus consiste en una secuencia de 8500 bases rodeadas de cuatro proteínas estructurales que forman una cápside icosaédrica (Rueckert, 1996). Estas proteínas son codificadas por los genes estructurales: VP1, VP2, VP3 y VP4 (Crowther, 1986) (Anexo2). Además, el virus tiene los genes no estructurales que forman un total de diez proteínas maduras: L, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D y los complejos 3AB y 3ABC (Ma, et. al., 2011). Se han identificado siete serotipos del virus (A, O, C, Asia 1, y SAT -South African Territories- 1, 2, y 3) (Rueckert, 1996), siendo el serotipo O el más común en casi todos los países del mundo, incluyendo al Ecuador (FAO, 2007).

### **1.4.2. Enfermedad de la Fiebre Aftosa**

La fiebre aftosa es una enfermedad infectocontagiosa vesicular de alta diseminación y de curso rápido (Díaz, et.al., 2011). Esta enfermedad afecta a los animales de pezuña hendida, incluyendo ganado vacuno, cerdos, ovejas y cabras, así como más de 70 especies de animales salvajes. La sintomatología en los animales empieza, luego de una incubación del virus de hasta 14 días, con falta de apetito, disminución de producción de leche, aumento de salivación y formación de úlceras en la boca y en las pezuñas. El contagio se da por aerosoles respiratorios, por vía oral o por contacto con células epiteliales de animales infectados (Ruiz-Bravo, 2001). Por ser la fiebre aftosa una enfermedad altamente infecciosa, sus brotes son muy difíciles de controlar.

### **1.4.3. Impacto de la enfermedad de la fiebre aftosa en el Ecuador y el mundo**

Desde el punto de vista económico, la fiebre aftosa es la enfermedad de ganado más importante a nivel mundial puesto que es sumamente infecciosa y afecta a cabras, ovejas, vacas, cerdos, entre otras (Ruiz-Bravo, 2001). Las zonas endémicas de la enfermedad son algunos países de Asia, gran parte de África y Medio Oriente. En Sudamérica la enfermedad también se considera endémica (Anexo 3) pero algunos países como Bolivia, Argentina y Colombia son considerados como zonas libres de aftosa con vacunación. El Ecuador tuvo su último brote grave de fiebre aftosa en el año 2009. Sin embargo, no ha sido declarado libre de la enfermedad y es posible que haya pequeños brotes ocasionales a pesar de las continuas campañas de vacunación de reses (OIE, 2014).

El potencial infeccioso de la enfermedad es tan alto, que al detectarse un brote de la enfermedad, en una granja de ganado, se debe proceder de inmediato al aislamiento y sacrificio de las reses para contener la expansión del virus dado que el tratamiento para las no es factible ni por el costo ni por la efectividad (FAO, 2007). Además, se prohíbe la exportación de productos lácteos y cárnicos a países libres de fiebre aftosa, lo cual puede generar pérdidas millonarias para el país que sufre el brote (OIE, 2014).

## **1.5. Prevención de la fiebre aftosa, sus problemas y posibles alternativas**

### **1.5.1. Prevención con vacunas tradicionales**

Una vacuna es cualquier preparación que tiene por objetivo generar inmunidad contra cierta enfermedad o infección mediante la estimulación de la producción de anticuerpos. Las vacunas tradicionales son preparaciones de microorganismos (bacterias o virus) atenuados o muertos, o preparados de toxinas inactivadas (toxoides) que estimulan el sistema inmunológico (OMS, 2015).

La vacuna antiaftosa oleosa que se utiliza para la inmunización de reses, en las zonas endémicas, como en el Ecuador de acuerdo a la Unidad de Epidemiología, PANAF-TOSA-OPS/OMS (OPS, 2011), consiste en el virus (cepas A, O, C) obtenido a partir de cultivo primario de células de epitelio lingual bovino, inactivado con BEI (Etilenimina binaria, preparado de aziridina). Esta se debe mantener lejos de la luz y en cámara de frío a una temperatura entre 4°C y 8° C para el almacenaje y a una temperatura menor de 15°C durante un máximo de 72 horas (Sani, 2004).

### **1.5.2. Problemas en la producción y manejo de las vacunas tradicionales**

Las vacunas tradicionales contra el virus de la fiebre aftosa, son producidas utilizando el virus vivo atenuado o inactivado, lo que implica necesariamente que el virus sea cultivado

en un laboratorio, en grandes cantidades. El virus de la fiebre aftosa no significa un riesgo para la salud humana, sin embargo, el riesgo de contagio al ganado es muy alta. Al ser el ganado una de las actividades económicas más importantes a nivel mundial, el manejo del virus obligatoriamente debe ser realizado con un estricto nivel de bioseguridad (BSL). Actualmente, la producción de la vacuna tradicional se está realizando en laboratorios con un nivel BSL 4 y un nivel 4 de contención (OIE, mayo 2014). Países como Estados Unidos, que tienen una producción de ganado muy alta, no producen la vacuna puesto que no son zonas endémicas para el virus y el riesgo de su liberación es muy alto (Homeland Security, 2013). En la India, el mayor productor de leche a nivel mundial, existe un laboratorio BSL nivel 4 para la producción exclusiva de vacunas anti aftosas contra las cepas presentes en la región (Pharmaquest, 2008).

El Ecuador, pese a ser un país en donde la enfermedad se considera endémica (OPS, 2011), no produce sus propias vacunas contra la fiebre aftosa debido a la falta de infraestructura adecuada y personal capacitado para el trabajo en un BSL 4. En consecuencia, la importación de las vacunas resulta en un alto costo de compra, transporte y manejo, además del riesgo de que la pérdida de la cadena de frío durante el transporte conduzca a una pérdida de eficacia de la vacuna (Pharmaquest, 2008).

Además de los riesgos de bioseguridad, las vacunas de la fiebre aftosa contienen el virus completo por lo que el individuo inoculado genera anticuerpos contra todas las proteínas del virus, haciendo imposible distinguir los animales infectados de los sanos que solo han sido vacunados (Homeland Security, 2013).

El manejo de las vacunas tradicionales también presenta serios inconvenientes como la necesidad de una estricta cadena de frío durante toda la manipulación de las dosis. La vacuna antiaftosa oleosa debe ser transportada y conservada para su uso inmediato entre 2 y 8°C. Temperaturas mayores pueden llegar a desestabilizar la vacuna en cuyo caso, la efectividad de la misma ya no puede ser garantizada (Pharmaquest, 2008).

### **1.5.3. Subunidades de vacunas como una alternativa para las vacunas tradicionales**

Las vacunas de subunidades nacen como una alternativa para las vacunas tradicionales. Consisten en porciones virales no viables y no infectivas del patógeno que son capaces de causar una estimulación inmunológica en el individuo vacunado (Moo-Yong, 1989). En el caso de los virus, estas partes pueden ser proteínas de la cápside, la cápside entera o, en general, proteínas exteriores del virus (Li et al., 2008).

Hoy en día los sistemas de expresión pueden ser utilizados para crear este tipo de vacunas. Uno de los primeros trabajos de este tipo se dio en 1992 con el virus de la hepatitis B. El gen utilizado para la expresión fue un antígeno de superficie que fue expresado en una planta de tabaco. Otras enfermedades que ya cuentan con vacunas recombinantes son: influenza, hepatitis B y el virus de papiloma humano (Chen, 2008).

Por lo tanto, las vacunas de subunidades permiten un ambiente de trabajo más seguro tanto para el operador como para el medio ambiente, puesto que ya no es necesario el cultivo del virus en estado salvaje. La subunidad (generalmente proteína) no es infectiva, por lo que no hay riesgo de fuga de la enfermedad. Gracias a esto, la producción de estas vacunas se puede hacer en laboratorios de bioseguridad BSL2 y con un nivel de contención 2 (Moo-Yong, 1989). Además son mucho más estables a la luz y al calor (González y Pérez, enero 2005). Por estas razones, este tipo de vacunas pueden ser una interesante alternativa para mitigar los problemas existentes con las vacunas tradicionales producidas para la fiebre aftosa.

#### **1.6. Utilización del sistema de expresión Bac-to-Bac para la producción de proteínas inmunogénicas de la fiebre aftosa que pueden ser utilizadas como posibles candidatos de subunidades de vacuna**

El sistema de expresión de proteínas heterólogas Bac-to-Bac, se refiere a un sistema de expresión de proteínas en células de insecto con un vector viral proveniente de un baculovirus. Las células Sf9, utilizadas para este sistema, son células derivadas de una polilla de la especie *Spodoptera frugiperda*.

##### **1.6.1. Ventajas sobre otros sistemas**

El sistema Bac-to-Bac permite una producción rápida y alta de baculovirus recombinantes. De esta forma, se obtiene proteínas recombinantes en una línea celular proveniente de insectos. Las ventajas del sistema Bac-to-Bac son: la posibilidad de una producción a gran escala de la proteína con altos rendimientos gracias a que el promotor que está incluido en el pFastBac™ es fuerte. Además, la purificación de la proteína es sencilla ya que el vector puede contener un 6xHis tag que permite una fácil separación de la proteína de interés (Invitrogen, 2010). Este sistema está considerado como una excelente herramienta para la producción de glicoproteínas recombinantes. Casi un millar de proteínas heterólogas han sido producidas satisfactoriamente en el sistema para la generación de vacunas, terapia génica e insecticidas de baculovirus recombinantes (Cultek, 2015).

### **1.6.2. Creación del vector bacmid a partir de un baculovirus**

Los baculovirus (Familia Baculoviridae) son virus de insecto con un fuerte tropismo hacia la especie que infectan (van Oers, 2006). Los baculovirus tienen un genoma de entre 80 y 180 Kpb y se replican en el núcleo de las células infectadas (Thiem y Cheng, 2009). Estos virus no poseen tropismo hacia mamíferos, por lo que no resultan patógenos en ganado, ni en seres humanos (van Oers, 2006).

Para la creación del sistema Bac to Bac, a través de ingeniería genética, el baculovirus fue modificado genéticamente, removiendo partes patógenas de su genoma, así como los genes que le permiten sobrevivir en la naturaleza y dejando los promotores tardíos  $p_h$  y  $p_{10}$  como promotores fuertes para la expresión de proteínas recombinantes (Invitrogen, 2010). Este baculovirus modificado se conoce como bacmid.

El sistema de expresión Bac-to-Bac tiene varias etapas que van desde la identificación de la proteína de interés, hasta su extracción y purificación. La primera parte consiste en identificar el gen que codifica para la proteína de interés y obtener el cDNA. Luego, este cDNA debe insertarse en un vector de transferencia (pFastBac) que contiene un promotor  $p_h$  o  $p_{10}$  y dos regiones flanqueantes (Tn7) a la zona de inserción del gen de interés.

Por otro lado, el sistema de expresión requiere de una cepa de *E. coli* DH10Bac que tiene en su interior el bacmid que contiene una región *miniattTn7* y un plásmido helper pMON7124 que codifica para una transposasa. Las células de *E. coli* deben ser transformadas con el pFastBac que lleva el gen de interés. Dentro de la célula, el plásmido helper provee la transposasa necesaria para que el cassette, flanqueado por los Tn7 del pFastBac, pase a transponerse en la región *miniattTn7* del bacmid (Invitrogen, 2010).

Para la producción de proteínas recombinantes, este bacmid se extrae de las células *E. coli* para ser transfectado en las células Sf9 que expresarán la proteína de interés para que posteriormente sea analizada y purificada (Invitrogén, 2010).

### **1.6.3. Expresión de proteínas inmunogénicas de la fiebre aftosa**

En el caso de la fiebre aftosa, las subunidades de vacuna podrían ser una interesante alternativa ya que se ha encontrado que la proteína VP1 que se encuentra en la cápside del virus tiene una cadena aminoacídica que se dispone en forma de bucle proyectado hacia el exterior, y es por tanto, activa en fenómenos de reconocimiento y antigenicidad (Rodríguez y Grubmann, 2009).

Por esta razón, en un trabajo previo (Palacios, et. al., 2011), se utilizó el sistema Bac to Bac para la creación de baculovirus recombinantes que llevan el gen VP1. En consecuencia, el

presente trabajo propone continuar con el sistema de expresión Bac-to-Bac (Baculovirus), el cual conllevará el establecimiento de un cultivo celular de células de insecto Sf9, seguido de la transfección con el bacmid recombinante mediante liposomas y el análisis de la expresión de la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa. VP1 podría en un futuro ser considerada como una proteína interesante para realizar estudios inmunogénicos en ganado que lleven a la posible creación de candidatos de subunidades para la fabricación de una vacuna contra la fiebre aftosa.

## **2. OBJETIVOS**

### **General**

- Establecer un sistema de expresión Bac-to-Bac para la generación de la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa.

### **Específicos**

- Establecer el cultivo de células Sf9 de insecto.
- Realizar la transfección de las células Sf9 con un bacmid recombinante
- Analizar la expresión de la proteína VP1 del virus de la fiebre aftosa mediante un SDS-PAGE.
- Establecer la tinción de proteínas en geles de poliacrilamida.

### 3. JUSTIFICACIÓN

Las complicadas condiciones de manejo de las vacunas actuales de virus inactivado para la fiebre aftosa (CAV, 2003), son una limitante en los programas de vacunación. Esto se debe a que a la enorme extensión de las haciendas ganaderas y el difícil acceso a las mismas, muchas veces no permite el cumplimiento de la cadena de frío necesaria. Además de las complicaciones de la producción de la vacuna, la complejidad de tener un laboratorio de nivel de bioseguridad 4 y los riesgos de fuga del virus durante su cultivo, no permiten que algunos países sean capaces de producir la vacuna. Este es el caso del Ecuador, en donde, a pesar de que el virus es endémico, exista la necesidad de importarla.

Actualmente, la generación de vacunas de subunidades espera superar las complicaciones de producción, inestabilidad, y riesgos de reacciones adversas de las vacunas tradicionales. Estas son mucho más estables a la luz y al calor debido a que no contienen elementos biológicamente activos, sino proteínas del patógeno (González y Pérez, 2005) y podrían ser una interesante alternativa para la producción de vacunas de la fiebre aftosa.

Es así que el establecimiento de un sistema de expresión de proteínas heterólogas es imperativo para la posible producción de subunidades de vacuna contra la fiebre aftosa y, en general, para el avance y desarrollo de la investigación de la industria biofarmacológica en el país. Actualmente existen varios sistemas de expresión que están siendo utilizados, todos contienen ventajas y desventajas. Sin embargo, un sistema casi ideal es aquel que no tenga un costo muy elevado, que tenga una alta capacidad de producción y un sistema de modificación post traduccional adecuado. Un sistema con estas características, es el sistema Bac to Bac con el cual ya se han producido cientos de proteínas recombinantes, muchas con aplicación industrial como son las subunidades de vacuna.

En un trabajo anterior (Palacios, et. al., 2013) se logró aislar y clonar el gen VP1 de la fiebre aftosa y generar un bacmid recombinante. Por eso, este trabajo propone establecer un cultivo celular de células Sf9 de insecto, que puedan ser transfectadas con el bacmid a fin de expresar la proteína VP1 de la cápside del virus de fiebre aftosa. Este análisis será importante porque abre el campo al desarrollo de sistemas de expresión en líneas celulares en el Ecuador.



#### **4. ÁREA DE ESTUDIO**

Los experimentos de este proyecto se realizaron en los Laboratorios de Virología, Microbiología y Biología Molecular de la Universidad San Francisco de Quito.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1. Materiales

#### 5.1.1. Establecimiento del cultivo celular

##### 5.1.1.1. Medio para el cultivo de células Sf9

- Medio de Cultivo Sf-900™ II SFM (1X) Gibco Life Technologies
- Medio ESF 921 Protein-Free Medium Expression Systems
- Suero fetal bovino FBS Hy Clone

##### 5.1.1.2. Mantenimiento de las células Sf9

- Medio de Cultivo Sf-900™ II SFM Gibco Life Technologies
- Suero fetal bovino FBS Hy Clone
- Pipetas desechables
- Etanol 70%
- PBS 1X
- Pipeta automática Matrix
- Cabina de seguridad biológica Biobase
- Microscopio invertido Ernst Leitz Wetzlar
- Refrigerador 4°C Ecasa

##### 5.1.1.3. Creación de un stock de células Sf9

- Suero Fetal Bovino FBS Hy Clone
- DMSO (dimethylsulfoxide) Merck
- Caja de congelación de células
- Congelador -80°C WiseCryo
- Nitrógeno líquido
- Viales de 1,2ml resistentes a la congelación
- Tubos falcon
- Centrífuga de tubos falcon de 15ml PLC Series

#### 5.1.2. Establecimiento del Sistema Bac to Bac

##### 5.1.2.1. Transfección de las células Sf9 con el bacmid recombinante

- Flask T-25 con confluencia del 100%

- Kit de transfección FectoFly™: DNA transfection reagent Polyplus
- 6-well plates Falcon
- Penicilina/Estreptomicina SIGMA Life Science
- Muestra de Bacmid Recombinante (Muestras Bacmid + VP1-2, Bacmid + VP1-5)
- Muestra de Bacmid no recombinante
- NanoDrop 1000 ThermoScientific
- Primers M13 (Anexo 6)

### **5.1.2.2. Análisis de la transfección por PCR**

#### **5.1.2.2.1. Preparación de las Muestras para el PCR**

- Solución de NaOH 200mM
- Agua destilada
- Buffer TE Tris HCl Invitrogen™ 10mM, EDTA Invitrogen™

#### **5.1.2.2.2. Preparación del Master Mix**

- Agua para PCR
- Buffer de reacción 10X Invitrogen Brasil
- Primer F 10µM Invitrogen™
- Primer R 10µM Invitrogen™
- MgCl<sub>2</sub> 50mM Invitrogen Brasil
- dNTPs 100mM Invitrogen™
- Taq Polimerasa 5µM Invitrogen™
- Termociclador BIO-RAD™ Thermal cycler

#### **5.1.2.2.3. Gel de Agarosa**

- Buffer TBE 1X Tris base Invitrogen™ 108g/L, Ácido bórico Amp™ 55g/L, EDTA Invitrogen™ 7.44g/L
- UltraPure™ Agarosa
- SyBR Safe® DNA Gel Stain Invitrogen
- Cámara de electroforesis Enduro Gel XL Labnet

**5.1.2.2.4. Buffer de Corrida**

- UltraPure™ TRIS
- Ácido Bórico Amp (All Molecular Grade)
- UltraPure™ EDTA

**5.1.2.2.5. Preparación para cargar las muestras**

- 10X Blue Juice™ Invitrogen
- Ladder 100pb Labnet

**5.1.3. Análisis de la expresión de proteínas recombinantes****5.1.3.1. Recolección del sobrenadante de las células Sf9 transfectadas con el bacmid recombinante**

- Tubos eppendorf de 1,5ml
- Pipetas desechables
- Parafilm
- Refrigerador 4°C Ecasa

**5.1.3.2. Recolección de las células Sf9 transfectadas con el bacmid recombinante**

- Tubos eppendorf de 1,5ml
- Pipetas desechables
- Parafilm
- Cell scrapers Costar
- Tubos falcon de 15ml
- Centrífuga para tubos falcon del 15ml
- PBS 1X
- Congelador -20°C Ecasa

**5.1.3.3. Amplificación del virus con el sobrenadante de la transfección de las células Sf9 con el bacmid recombinante**

- Flask T-25 100% confluyente
- Medio de cultivo SF 9000-II (1X)
- Pipetas desechables
- Sobrenadante de la transfección
- Flasks T-25 Falcon
- Incubadora 27°C Memert

#### **5.1.3.4. Análisis mediante una electroforesis de proteínas SDS-PAGE**

##### **5.1.3.4.1. Preparación de las muestras**

- Muestra de sobrenadante de células Sf9 infectadas
- Muestra de células infectadas
- Buffer de carga 2X (0,125M Tris-HCl Invitrogen, pH 6.8, 4% SDS; 20% Glicerol; 10% 2-β-mercaptoetanol y 50μl azul de bromofenol 1%)

##### **5.1.3.4.2. Preparación del gel de poliacrilamida**

- Agua destilada
- Monómero (acrilamida y bei-acrilamida) 30% Invitrogen
- Buffer de resolución (1.5M Tris Invitrogen, pH 8.8)
- Buffer pre resolutivo (1.0M Tris Invitrogen, pH 6,8)
- SDS 10%
- Persulfato de amonio 10% Baker™
- TEMED Invitrogen™
- Isopropanol Merck™

##### **5.1.3.4.3. Electroforesis de proteínas**

- Equipo de electroforesis de proteínas SDS-PAGE
- Tank buffer 1X
- Fuente de poder Thermo Scientific
- Buffer de carga 2X (0,125M Tris-HCl, pH 6.8, 4% SDS; 20% Glicerol; 10% 2-β-mercaptoetanol y 50μl azul de bromofenol 1%)

##### **5.1.3.4.4. Tinción del gel con nitrato de plata**

- Solución de Fijado (50% etanol, 12% ácido acético Merck, 0,05% formaldehído Baker™ 35%)
- Solución de Lavado (20% etanol)
- Solución de Sensibilización (0,02% tiosulfato de sodio Panreac)

- Solución de Teñido (0,2% nitrato de plata Fisher Scientific™ 2g/L, 0,076% formaldehído 35% Baker™)
- Solución de Revelado (6% carbonato de sodio, 0,0004% tiosulfato de sodio Panreac, 0,05% formaldehído 35% Merck)
- Solución de Parada (12% ácido acético Merck)

## **5.2. Métodos**

### **5.2.1. Establecimiento del cultivo celular**

#### **5.2.1.1. Medio para el cultivo de las células Sf9**

El medio de cultivo utilizado para las células Sf9 fue el Sf-900™ II SFM Gibco Life Technologies, el cual viene preparado en forma líquida. El medio se conservó a 4°C. Se realizó alícuotas del mismo para prevenir contaminaciones. Con este medio se preparó el medio de mantenimiento el cual llevó, 5% de suero fetal bovino (FBS) HyClone y 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina SIGMA Life Science.

#### **5.2.1.2. Mantenimiento de las células Sf9**

El medio de cultivo para el mantenimiento de las células fue Sf-900™ II SFM Gibco Life Technologies con 5% de FBS HyClone y 1% de antibiótico penicilina/estreptomicina SIGMA Life Science.

Cada vez que las células consiguieron un 90-100% de confluencia, se les realizó un subcultivo. Para esto, se pipeteó con fuerza el medio contra las células con la finalidad de levantarlas. Posteriormente se subcultivó 1ml de la suspensión de células en tres flasks T-25 nuevos y se añadió 3 ml de medio de cultivo fresco. Los flask T-25 se incuban con un volumen final de 4ml y los flasks T-75 con un volumen final de 12ml. Los flasks se incubaron a 27°C.

#### **5.2.1.3. Mantenimiento de un stock de células Sf9**

La congelación de las células se hace a partir de flasks 100% confluentes. Un flask T-25 (que contiene 7 millones de células aproximadamente) se congeló en un vial de 1,2 ml, mientras que un flask T-75 (que contiene 12 millones de células aproximadamente) se congeló en dos viales 1,2ml.

El medio para congelación consistió en 10% de DMSO con 90% de FBS.

Con ayuda de una pipeta, se levantó todas las células de los flask que se debían congelar. Después se centrifugó la suspensión de células durante 5 minutos a 1500rpm. Se descartó

todo el sobrenadante y se resuspendió el pellet usando medio para congelar (1ml de medio de congelación por cada vial a congelar). Rápidamente se puso 1ml de suspensión de células en cada vial. Estos se colocaron en la caja de congelación (caja de plástico cubierta con espuma flex y con isopropanol hasta 1/3 de su volumen) y se congelaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Después de 24 horas, los viales se retiraron del congelador e inmediatamente fueron sumergidos en nitrógeno líquido para su conservación.

## **5.2.2. Establecimiento del Sistema bac to bac**

### **5.2.2.1. Transfección de las células Sf9**

Para la realización de la transfección se utilizó el protocolo de FectoFly<sup>TM</sup> (Polyplus, 2013) el cual será detallado en los siguientes párrafos.

De un flask T-25 100% confluyente (aproximadamente  $7 \times 10^6$  células), se retiró todo el medio de cultivo y se lo descartó. Se tomó 9,6ml de medio sin antibióticos y se levantó las células del flask pipeteando fuerte. Se puso 1,6ml ( $2 \times 10^6$  células) de esta suspensión de células en 4 pocillos del 6-well plate (para tener un control negativo mock y tres infecciones: una con bacmid y dos con bacmid+VP1) y se incubó a  $27^{\circ}\text{C}$  durante 2 horas.

Posteriormente, se descongeló las muestras de bacmid y bacmid + VP1. Se calculó las concentraciones de ADN en cada muestra y se determinó la cantidad requerida de acuerdo al protocolo, como se puede observar en la Tabla 1.

Siguiendo el protocolo (Anexo 4), se diluyó es tres tubos de 1,5 ml distintos:

- 3,75 $\mu\text{l}$  de bacmid en 100 $\mu\text{l}$  de solución NaCl 150mM,
- 12,2 $\mu\text{l}$  de bacmid + VP1-2 en 100 $\mu\text{l}$  de solución NaCl 150mM y
- 3,6 2 $\mu\text{l}$  de bacmid + VP1-5 en 100 $\mu\text{l}$  de solución NaCl 150mM,

Además, en un tubo de 1,5ml se diluyó 27  $\mu\text{l}$  de FectoFly en 300 $\mu\text{l}$  de solución NaCl 150mM.

Después, se añadió:

- 100 $\mu\text{l}$  de la mezcla de FectoFly al tubo de la muestra bacmid,
- 100 $\mu\text{l}$  de la mezcla de FectoFly al tubo de la muestra bacmid + VP1-2 y
- 100 $\mu\text{l}$  de la mezcla de FectoFly al tubo de la muestra bacmid + VP1-5.

Se mezcló las muestras con un vórtex por 10 segundos y se las incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Una vez finalizada la incubación de las células en el 6-well plate, se retiró el medio de cultivo de todos los pocillos, exceptuando el mock y se añadió la solución de transfección (FectoFly con ADN) correspondiente a cada pocillo, gota a gota, sobre las células distribuyendo la

mezcla de forma uniforme. Se incubó el 6-well plate durante 4 horas, rotándolo cada 10 minutos para evitar la deshidratación de las células. Posteriormente, se desechó la solución de transfección y se puso 2 ml de medio de mantenimiento. Se incubó 72 horas a 27°C.

#### **5.2.2.2. Análisis de la transfección por PCR**

##### **5.2.2.2.1. Recolección de sobrenadante y células transfectadas**

Después de 72 horas de haber realizado la transfección, se verificó que la morfología de las células transfectadas con bacmid recombinante haya cambiado de redondas pequeñas a ovaladas grandes y que algunas de las células se hayan despegado del fondo del pocillo, lo que indicó que las mismas fueron infectadas con éxito.

Se extrajo 1,5ml del medio de cada pocillo y se puso en un tubo eppendorf. Además, se despegó las células de la superficie del pocillo con un scraper y se recogieron en otro tubo eppendorf. Estos tubos fueron centrifugados a 1500rpm durante 8 minutos. El sobrenadante se recogió en un solo tubo de 1,5ml, se selló con parafilm y se almacenó a 4°C. El pellet de células se resuspendió en 200µl PBS 1X y se dividió en 4 alícuotas que se almacenaron a -20°C.

##### **5.2.2.2.2. Lisis de las células para el análisis del ADN**

Se alicuotó 30µl de cada una de las muestras recolectadas (células y sobrenadantes de la transfección) en tubos eppendorf de 1,5ml. Se añadió en cada tubo 50µl de solución NaOH 200mM y 100µl de agua destilada. Se mezcló bien y se llevó a ebullición durante 10 minutos. Se enfrió los tubos a temperatura ambiente y se agregó 50µl de buffer TE.

##### **5.2.2.2.3. Preparación del Master Mix**

Se preparó el mastermix en un tubo eppendorf de 1,5ml siguiendo las cantidades y concentraciones especificadas en la Tabla 2. Se llevó los tubos al termociclador BIO-RADTM Thermal cycler y se programó las condiciones para PCR especificadas en la Tabla 3. Se almacenó los tubos a 4°C para su posterior análisis.

##### **5.2.2.2.4. Gel de Agarosa**

Se preparó un gel de agarosa al 1,5% para lo cual se pesó 0,75g de UltraPure™ Agarosa y se disolvió en 50ml de TBE 1X en el microondas hasta que la solución fuera totalmente transparente. Inmediatamente, se puso 2µl de SyBR Safe® DNA Gel Stain en la solución, se mezcló y vertió sobre el molde y se puso la peñilla. Se dejó enfriar durante 30 minutos en la refrigeradora en ausencia de luz.



#### **5.2.2.2.5. Buffer de Corrida**

Se preparó una solución stock de TBE concentrada (5X). Para esto, se pesó 54g de UltraPure™ TRIS y 27,5g de ácido bórico amp (All Molecular Grade) y se disolvió en 800ml de agua. Se agregó 20 µl de una solución de EDTA 0,5M pH 8. Se aforó hasta 1 litro con agua destilada.

Para usar, la solución stock se diluyó hasta una concentración 1X.

#### **5.2.2.2.6. Electroforesis en agarosa**

Se mezcló 15µl de muestra y 4µl de blue juice, y se cargó 19µl por cada pocillo.

Finalmente se cargó 5µl de ladder de 100pb de la marca Labnet en un pocillo. Se corrió la electroforesis durante 45 minutos a 100 voltios.

### **5.2.3. Infección de células Sf9 con el bacmid recombinante**

#### **5.2.3.1. Amplificación del virus recombinante obtenido en la transfección**

Una vez realizada la transfección, se utilizó el sobrenadante de la misma para amplificar el baculovirus que contiene VP1. Para este propósito, a un flask T-25 100% confluyente se le retiró todo el medio de cultivo y con 3ml de medio de cultivo fresco se resuspendió todas las células pipeteando con fuerza.

En tres flasks nuevos se colocó 0,9ml de la suspensión de células ( $3 \times 10^6$  cél/ml) y se añadió 2ml de medio fresco y se incubó durante 1 hora a 27°C.

Después se removió todo el medio. Se tomó 500µl del sobrenadante de la transfección y se colocó en cada uno de los flasks. Se incubó los tres flasks durante 2 horas con agitación.

Posteriormente, se removió el medio y se colocó 4ml de medio nuevo en cada uno de los flasks y se incubó a 27°C durante 96 horas.

#### **5.2.3.2. Infección de células Sf9 con el virus amplificado**

Se levantó las células de dos flasks T-25 100% confluentes con 3ml de medio fresco cada uno. En cinco flasks nuevos se depositó 0,9ml de la suspensión de células ( $3 \times 10^6$  cél/ml), y se añadió 2ml de medio fresco. Se incubó durante 1 hora a 27°C.

Después, se removió todo el medio. Se tomó 500µl del virus amplificado y se colocó en cada uno de los 4 flasks tratamiento, mientras que el control negativo mock se conservó sin el virus. Se incubó los cinco flasks durante 2 horas en agitación. Pasado este tiempo, se removió el medio y se colocó 4ml de medio nuevo en cada uno de los flasks. Se los incubó a 27°C.

### **5.2.3.3. Recolección de células y sobrenadantes de la infección**

Se colectó las células y sobrenadantes de la infección cada 24 horas durante 4 días (Un flask cada día). Para la recolección, se usó el mismo protocolo de la sección 5.2.2.2.1.

Así, se tuvo muestras de células y sobrenadantes de la infección colectadas 24, 48, 72 y 96 horas post infección (hpi), además de las células y sobrenadantes del control negativo mock.

## **5.2.4. Análisis mediante una electroforesis de proteínas SDS-PAGE**

### **5.2.4.1. Preparación de las muestras**

Las muestras analizadas fueron: Células mock, 24hpi, 48hpi, 72hpi, 96hpi y sobrenadantes mock, 24hpi, 48hpi, 72hpi, 96hpi.

Tanto las muestras de sobrenadante de la infección como de las células infectadas se llevaron a temperatura ambiente. Se alicuotó en tubos eppendorf de 1,5ml, 25µl de cada muestra y 25µl de buffer de carga 2X. Estos tubos se llevaron a ebullición durante 10 minutos.

### **5.2.4.2. Preparación del gel de poliacrilamida**

Se limpió los vidrios de la cámara con etanol al 70%. Se selló la parte inferior con un gel de agarosa 1%, preparado con 0,2g de agarosa y 20ml de agua destilada.

Se preparó el gel resolutivo de poliacrilamida mezclando: 1,7ml de agua destilada, 2ml del monómero (acrilamida y bis-acrilamida) 30%, 1,25ml de buffer de resolución (1.5M Tris, pH 8.8), 50µl de SDS 10%, 50 µl de persulfato de amonio 10%, y 5µl de TEMED. Se llenó  $\frac{3}{4}$  del espacio entre los vidrios y finalmente se colocó una capa de isopropanol. Se dejó polimerizar durante 20 minutos y se retiró el isopropanol.

Se preparó el gel pre resolutivo de poliacrilamida, mezclando 1,5ml de agua destilada, 325µl del monómero (acrilamida y bis-acrilamida) 30%, 625µl de buffer pre resolutivo (1.5M Tris, pH 8.8), 25µl de SDS 10%, 75µl de persulfato de amonio 10%, y 5µl de TEMED. Se llenó el espacio entre los vidrios con el gel y rápidamente se colocó la peinilla. Se dejó polimerizar durante 2 horas al menos.

### **5.2.4.3. Electroforesis de proteínas**

Se colocó el gel dentro de la cámara de electroforesis y se la llenó con Tank buffer 1X. Se corrió el gel durante: 20 minutos a 50 voltios y 20mA; y luego durante 90 minutos a 225 voltios y 50mA.

#### **5.2.4.4. Tinción del gel con nitrato de plata**

Se colocó el gel en un recipiente plástico completamente limpio y se lo cubrió con la solución de fijado durante 2 horas manteniéndolo en movimiento. Después se descartó toda la solución de fijado y se cubrió el gel con solución de lavado durante 20 minutos en movimiento continuo. Se descartó esta solución y se puso la solución de sensibilización durante 2 minutos. Se descartó. Se hizo 2 lavados seguidos con agua destilada, cada uno con una duración de un minuto. Inmediatamente se sumergió el gel en la solución de tinción que estaba a 4°C, durante 20 minutos. Esta solución se descartó en un recipiente de vidrio para desechos. Se hizo dos lavados más con agua destilada, cada uno durante 40 segundos. Posteriormente, se enjuagó el gel con solución de revelado y se descartó esa solución. Luego se puso 150ml de solución de revelado sobre el gel durante 3,5 minutos o hasta que las bandas se tiñeran de color café, e inmediatamente, sobre la solución de revelado, se añadió 25ml de solución de parada.

Las bandas se pudieron observar a simple vista.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Establecimiento del cultivo celular de Sf9

El establecimiento del cultivo de células de insecto (línea celular Sf9) fue exitoso. Las células crecieron en medio SF-900 II, 1% de penicilina/estreptomicina y 5% de suero fetal bovino durante la fase de adaptación al cultivo en monocapa. Después se las cultivó en el medio ESF-921 puro con el propósito de facilitar el análisis de la expresión de proteínas y evitar que las proteínas que corresponden al FBS interfieran con la identificación de las proteínas expresadas por las células.

Se determinó que la cantidad ideal de medio para que las células crezcan bien es 4ml en un flask T-25 como se puede ver en la Figura 1a. En la Figura 1b se puede observar las células Sf9 que crecieron adheridas a la superficie del flask con la morfología deseada: pequeñas, forma esférica, regulares y uniformes.

El 100% de confluencia de un flask T-25 (7 millones de células), se logró luego de 4 días de incubación a 27°C. En un flask T-75, la confluencia (12 millones de células) se logró en 7 días. La confluencia total del flask se da cuando las células cubren por completo la superficie como se puede observar en la Figura 2.

### 6.2. Establecimiento del Sistema bac to bac

#### 6.2.1. Aislamiento del bacmid a partir de las bacterias competentes *E. Coli*

##### DH10Bac™

Las bacterias *E. Coli* DH10Bac™ que fueron transformadas con el bacmid recombinante que contenía el inserto VP1 (Palacios et. al., 2013) se lisaron y el bacmid fue extraído. La presencia del bacmid se verificó mediante una electroforesis en agarosa como se observa en la Figura 3. Además mediante PCR con primers específicos para VP1 (Palacios, et. al., 2013) (Anexo 5), también se verificó que el inserto estuvo presente (Figura 3).

Para comprobar que el fragmento VP1 estaba insertado en el lugar correcto, se hizo un PCR en la zona de transposición del pFastBac. Para esto se utilizó primers M13 (Invitrogen, 2010) (Anexo 6) que son flanqueantes de la zona *miniattTn7* (Invitrogen, 2010) (Anexo 7). Se observó una banda con un tamaño de 2942pb que se muestra en la Figura 4. Esta banda corresponde a las regiones del bacmid flanqueantes a la zona *miniattTn7* (2300pb) más el tamaño del fragmento VP1 (642pb). Este resultado indica que la transposición de VP1 se dio en el lugar correcto del bacmid.

### **6.2.2. Transfección de las células Sf9**

Las células Sf9, fueron transfectadas con 3 muestras distintas: una muestra de bacmid no recombinante (bacmid) y dos muestras de bacmid recombinante con VP1 (bacmid + VP1-2 y bacmid + VP1-5). Además hubo un control negativo de la transfección, llamado mock, que consiste en las células Sf9 a las que no se les agregó FectoFly+ADN.

La transfección fue comprobada con el cambio en la morfología de las células transfectadas versus el control negativo o mock. Las células transfectadas mostraron, a partir de las 48 horas post transfección, una forma alargada u ovalada y un mayor tamaño (Figura 5). En adición a estas características, las células transfectadas crecieron en menor cantidad que las células mock.

### **6.3. Infección de células Sf9 con el virus amplificado**

La infección se hizo en 4 flasks diferentes para comprobar las diferencias en la morfología de las células después de 24hpi, 48hpi, 72hpi y 96hpi. En la Figura 6, se observa que al pasar el tiempo de exposición de las células al virus, las células aumentan su tamaño y además el número de células decrece. Esto indicó que la infección fue exitosa.

Las células y sobrenadantes de cada flask (mock, 24hpi, 48hpi, 72hpi y 96hpi) fueron recolectados y se después de lizarlos, se hizo un PCR en búsqueda del inserto VP1. En la Figura 7 se evidencia que las muestras de células infectadas y los correspondientes sobrenadantes amplificaron el segmento VP1. Se consiguió amplificar el fragmento esperado.

### **6.4. Análisis de la expresión de la proteína VP1 mediante una electroforesis SDS-PAGE**

Se realizó una electroforesis SDS-PAGE con las muestras de mock y sobrenadantes de las mismas muestras analizadas por PCR (mock, 24hpi, 48hpi, 72hpi y 96hpi).

La banda esperada correspondiente a VP1, debería estar situada en un peso de 12kDa (Nagarajan, et. al., 2008).

En la Figura 8, se observa el gel de acrilamida teñido con azul de coomasie en donde no se pudo notar una diferencia significativa entre las proteínas del mock y las de las células infectadas. Además, la proteína VP1, que debería expresarse en grandes cantidades no se pudo apreciar como una banda fuerte en el gel, por lo que se prevé que esta no está siendo expresada por las células o que, de estarlo las concentraciones son muy bajas.

Se hizo el mismo ensayo de SDS-PAGE con células cultivadas en medio ESF-921 sin proteínas, para eliminar del análisis las proteínas correspondientes al suero fetal bovino

(resultado no mostrado), pero al no encontrar presencia de bandas, se procedió a hacer una tinción con nitrato de plata, cuyo margen de detección es entre 50 y 100 veces mayor al del azul de Coomasie (Simpson, 2007).

En la Figura 9, se muestra el gel de poliacrilamida tras el proceso de teñido con nitrato de plata. En este gel, se corrió las muestras de las infecciones en células Sf9 que crecieron en medio SF-9000 adicionado con FBS.

La presencia de la proteína VP1 se esperaba en las muestras de células infectadas o de sobrenadantes de las infecciones, pero no en el mock. Sin embargo, no se pudo observar una diferencia clara entre las bandas presentes en el mock y las células infectadas. La gran cantidad de proteínas del FBS del medio formó manchas en las muestras de sobrenadantes.

En la Figura 10 se muestra un gel de SDS-PAGE con las muestras de células infectadas cultivadas en medio ESF-921 sin proteínas, teñido con nitrato de plata. En esta imagen, tampoco se puede notar diferencia entre el mock y las células infectadas.

Se consideró la posibilidad de que la proteína VP1 pudiera secretarse al medio extracelular, por lo que los sobrenadantes de las células fueron analizados también mediante un SDS-PAGE con tinción con nitrato de plata. En este caso, se esperaba encontrar una sola banda de 12kDa, debido a que el medio de cultivo de las células no contenía proteínas y tampoco fue adicionado con FBS. En la Figura 11 no se observa ninguna banda, lo que quiere decir que no hay ninguna proteína presente en el medio extracelular.

## 7. DISCUSIÓN:

La expresión de proteínas recombinantes en líneas celulares constituye un enorme avance en la ciencia y en la industria. Sus múltiples aplicaciones convierten las técnicas de expresión proteica en prioridades de investigación (Pontén, et. al., 2009). El sistema de expresión Bac to Bac tiene una ventaja fundamental que es la alta expresión de proteínas recombinantes debido a que se basa en una transposición direccionada de gen(es) de interés bajo la expresión de un promotor muy fuerte del baculovirus (Invitrogén, 2010). Además el sistema Bac to Bac cuenta con varias ventajas dentro del manejo en el laboratorio que lo convierten en un método más seguro de generación de proteínas que el uso de líneas celulares de mamífero o que métodos tradicionales de cultivo de microorganismos completos en el laboratorio (Stacey y Possee, 1996).

Este trabajo consistió en el establecimiento del sistema de expresión Bac to Bac para la generación de la proteína inmunogénica VP1 de la fiebre aftosa. De acuerdo a este propósito, se inició con el establecimiento de un cultivo celular Sf9 de insecto, derivado de un cultivo primario de células de la especie *Spodoptera frugiperda* y con la extracción de un bacmid construido previamente (Palacios, et. al., 2013), que contenía el gen VP1 proveniente de la cápside del virus de fiebre aftosa.

Este bacmid fue utilizado para la creación de un baculovirus recombinante capaz de infectar células Sf9 para el análisis de la expresión de VP1.

El establecimiento de un cultivo celular requiere, fundamentalmente, el manejo de un ambiente estéril ya que las líneas celulares son altamente susceptibles a contaminación con virus y bacterias. Por esta razón, todo el trabajo se realizó en una cabina de seguridad biológica nivel 2. La recuperación inicial de las células Sf9 se hizo con el medio SF-9000 complementado con 5% de FBS que promueve el crecimiento celular y 0,5% de antibiótico (penicilina/estreptomicina) que se utiliza para evitar contaminaciones con bacterias gram+ y gram- que puedan introducirse por el manejo del cultivo. Esta combinación de antibióticos se ha definido para células de insecto Sf9 basándose en el grado de citotoxicidad de los antibióticos y la respuesta celular al mismo (Vitrocell, 2009).

La creación de un stock de células congeladas es muy importante para tener siempre disponibles células viables y jóvenes. La eficiencia de las infecciones y transfecciones hechas en células disminuye a medida que las células tienen un número de pasaje o subcultivo mayor, por el envejecimiento del cultivo celular (Invitrogen, 2010). El proceso

de congelamiento celular se hizo con células que estuvieran bajo el pasaje 12 (con menos de 12 subcultivos) para asegurar la viabilidad posterior de las células.

La congelación se hizo utilizando DMSO 10% que es un crioprotector que permite que las células se congelen sin formar cristales que podrían lisar las membranas celulares causando la muerte (ATCC, 2010). Existen otros tipos de crioprotectores como el glicerol o propanediol. Sin embargo, basándose en el perfil biofísico de las células Sf9 obtenido con ensayos de permeabilidad y volumen osmóticamente inactivo con diferentes criopreservantes, se ha determinado que el DMSO es el crioprotector que funciona mejor (Ávila-Portillo, et. al., 2006). Un problema del DMSO es que a temperaturas ambientales, es tóxico para las células cuando se encuentra en una concentración mayor a 0,1% (ATCC, 2010). Por eso, la descongelación de las células es un proceso que debe ser hecho con gran rapidez.

Inicialmente, el uso de penicilina/estreptomicina fue necesario para evitar contaminaciones, sin embargo, al aumentar el nivel de experticia en el manejo de la técnica aséptica, el uso del antibiótico no fue necesario. La contaminación por bacterias o levaduras se puede observar al microscopio como manchas entre las células y se puede confirmar con una tinción gram. Una vez que un cultivo celular se contamina, este debe ser desechado.

Las células Sf9 son fuertes por lo que pueden crecer durante 4-6 días sin necesidad de un pase. Sin embargo, se observó que cuando las células se mantienen en el medio durante 6 a 7 días, luego del subcultivo el crecimiento es lento. Este fenómeno se debe a que las células alcanzan la fase estacionaria de crecimiento alrededor de los 5 días de cultivo (Novagen, 2002). Al ser subcultivadas en fase estacionaria, las células necesitan de una fase lag de adaptación más larga que cuando son subcultivadas en fase de crecimiento exponencial. Para que las transfecciones sean exitosas, es recomendable que las células se hayan mantenido siempre en fase logarítmica o exponencial, por lo que, los pases se hicieron cada 4 días hasta que alcanzaran la confluencia del flask como se muestra en la Figura 2.

En la Figura 3 se puede observar que el gen VP1 está presente en el bacmid. Además, en la Figura 4 se confirmó la correcta inserción de este gen en el bacmid, al amplificar la región del bacmid en la que se insertó el gen. Esta zona, como se puede observar en el Anexo 7, contiene el inserto y además las regiones flanqueantes de la zona *miniatt*Tn7 que es en donde ocurre la transposición. De acuerdo a estos resultados, el vector bacmid recombinante está en buenas condiciones para ser transfectado en las células Sf9. Si este vector bacmid llega



al núcleo de las células Sf9, su ADN debería ser transcrito al mismo tiempo que el ADN celular y por tanto la traducción de la proteína VP1 debería ocurrir.

El bacmid, a diferencia del baculovirus, no tiene capacidad infectiva autónoma, por lo que la infección de las células Sf9 no es posible de forma natural (Invitrogen, 2010), es por esto que se requiere una transfección que consiste en la introducción de ADN o ARN foráneo en una célula mediante métodos químicos o físicos como la electroporación o la lipofección (Life Technologies, 2015). En este caso, se utilizó esta última (Anexo 8), como opción para la transfección del bacmid en las células de insecto Sf9, utilizando el agente FectoFly™ (Anexo 9). La verificación de la transfección se hizo basándose en la morfología celular. En la figura 5, se observa claramente que las células transfectadas son muy diferentes de las no transfectadas. Las células alargadas y heterogéneas en el cultivo, además de células levantadas del flask indican que la transfección fue exitosa. Esta diferencia morfológica es la única prueba del éxito de la transfección en este punto, por lo que es muy importante diferenciar las células grandes y alargadas que demuestran transfección de las células mock que son pequeñas y circulares (Life Technologies, 2015).

El bacmid se reproduce en la célula Sf9 transfectada, y se libera al medio extracelular, partículas víricas que pueden ser recolectadas en el sobrenadante de la transfección. Este medio contiene estas partículas virales en cantidades muy bajas. Por esta razón, el virus debe ser amplificado para contar con una concentración mayor de partículas virales infectivas (Invitrogen, 2010).

Es importante tener en cuenta que la replicación continua del virus en una línea celular genera mutaciones en la secuencia del mismo que pueden llegar a tener repercusiones en la expresión de la proteína de interés resultando en un mal plegamiento o incluso en la ausencia de expresión (Li, et. al., 2008). La amplificación se hizo una sola vez y el virus se almacenó a 4°C en ausencia de luz. Este virus no debe ser congelado porque la continua congelación y descongelación altera la integridad del ADN (Invitrogen, 2010).

Una vez el virus fue amplificado, los ensayos de infección se realizaron para analizar la expresión de la proteína VP1. El ensayo de infección se hizo colectando células y sobrenadantes cada 24 horas durante 96 horas. La elección de 96 horas de ensayo se basa en que se conoce que la mayor cantidad de proteínas secretadas al medio extracelular es evidente entre las 30 y 72 horas post infección y que las proteínas intracelulares se producen entre las 24 y las 96 horas post infección (Terpe, 2006). Al hacer el ensayo de infección y recolectar tanto células como sobrenadantes a las 24, 48, 72 y 96 horas post infección, se

contempló todas las posibilidades de expresión de la proteína. Es importante en este punto tener en cuenta que las células secretan proteasas al medio extracelular y que si la proteína de interés es secretada y mantenida durante mucho tiempo sin coleccionar, estas proteasas podrían degradarla (Nagaraján, et. al., 2008). En el trabajo de Gotoh, et., al (2001), se reporta que la actividad proteolítica intracelular y extracelular en cultivos de células de insecto Sf9 y la potencial necesidad de agregar inhibidores proteolíticos al medio de cultivo para mejorar la producción de proteínas recombinantes.

La infección se controló observando la morfología de las células, al igual que en la transfección. En la Figura 6 se puede observar el cambio en la morfología y en la densidad de células en las distintas horas post infección (hpi).

Los signos de infección celular varían entre líneas celulares o inclusive dentro de la misma línea celular. En la etapa temprana (24 hpi), las células podrían mostrar un ligero crecimiento mayor al normal (Invitrogen, 2010), aunque en la Figura 6a, las células no se ven muy distintas de las células no infectadas. En la etapa tardía que va desde las 24 hpi hasta las 72 hpi, se puede apreciar la mayoría de cambios: las células dejan de multiplicarse, su diámetro aumenta y el núcleo de las células ocupa casi todo el interior de estas. Esta última característica de las células infectadas se relaciona con el hecho de que el ADN foráneo debe ingresar al núcleo y, al estar el gen precedido por un promotor fuerte, la transcripción del mismo se da en grandes cantidades (Nagaraján, et. al., 2008). Incluso se puede ver que las células empiezan a desprenderse de la superficie del flask, lo que se puede explicar por la muerte celular debida a la infección (Invitrogen, 2010).

La etapa de infección muy tardía, pasadas las 96 hpi, es la etapa de lisis celular.

Todas las etapas de la infección se pudieron observar durante las 96 horas del ensayo de infección de las células Sf9 (Figura 6), indicando que este ensayo fue exitoso.

Además de la observación de la citopatología de las células, un análisis indispensable fue la amplificación positiva por PCR de VP1 (Figura 7), lo que evidenció una vez más que tanto la transfección, como la amplificación y la infección de células se llevaron a cabo.

La proteína VP1, es una proteína estructural de la cápside del virus de la fiebre aftosa que tiene un tamaño de 12kDa (Nagaraján, 2008). Para el análisis de su expresión se hizo una electroforesis de proteínas SDS-PAGE. Esta técnica consiste en la desnaturalización de las proteínas con un buffer que contiene b-mercaptoetanol y SDS. El b-mercaptoetanol rompe los puentes disulfuro de las proteínas y de esta manera permite que se desdoblén hasta su estructura lineal. El SDS que es un detergente catiónico que carga negativamente todas las

proteínas sin importar los aminoácidos que las conformen para que estas migren a través del gel de acrilamida conforme a su peso molecular (García, 2000).

La banda esperada debería estar entre 14,8kDa y 6kDa, de acuerdo al ladder usado (Life Technologies, 2015). La electroforesis de proteínas es probablemente uno de los métodos más importantes para el análisis de proteínas que existe y por lo tanto, su uso es válido. Sin embargo hay que tener en cuenta que la única información que provee es la del tamaño de la proteína, más no la naturaleza de la misma ni la eficacia biológica que esta pueda tener (García, 2000).

Cuando las muestras de células infectadas que crecieron en medio adicionado con FBS fueron corridas en el gel de acrilamida y posteriormente teñidas con azul de coomasie, (Figura 8), se reveló una gran cantidad de proteínas. No obstante, ninguna diferencia sustancial entre la muestra de control negativo mock y las infecciones pudo apreciarse. Es posible que las proteínas de las células o del FBS coincidan con el tamaño de la proteína VP1 y que por esta razón no se pueda visualizar una banda única correspondiente a las células Sf9 infectadas.

Debido a la posibilidad de que la proteína se exprese en cantidades bajas, se decidió utilizar un tipo de detección de proteínas altamente sensible que es la tinción con nitrato de plata (Chevallet, et. al., 2007). La tinción con nitrato de plata puede teñir proteínas que están en concentraciones en el rango de nanogramos con el fundamento de que los iones de plata se unen a las proteínas (Chevallet, et. al., 2007).

De la misma forma en las Figuras 9 y 10 no hay diferencias entre las células infectadas y el control negativo mock, por lo tanto se debe considerar dos posibilidades: La primera es que la proteína se esté expresando en cantidades bajas y que las células tengan proteínas de tamaños similares por lo que la visualización de la proteína no es clara. La segunda posibilidad es que la proteína no se esté expresando.

En el caso de que la proteína se esté expresando en bajas cantidades y no pueda ser observada claramente, se debe ligar la expresión baja de la proteína de interés con la concentración de virus utilizada. La concentración del virus o MOI (multiplicity of infection) es la tasa de partículas virales infectivas por cantidad de células que pueden ser infectadas (Invitrogen, 2010).

Si el MOI hubiera sido muy bajo, la cantidad de células infectadas habría sido baja también y a pesar de que en la amplificación por PCR el inserto pueda ser visualizado, la cantidad de células infectadas que producen la proteína podría ser demasiado bajo para su detección en

la SDS-PAGE. De la misma forma, si el MOI es demasiado alto, la infección se puede ver inhibida por exceso de virus que infectan la célula y la matan la célula antes de que se produzca la expresión de la proteína (Invitrogen, 2010).

Otra explicación es que la proteína VP1 no se esté expresando a pesar de que el gen VP1 está presente en las muestras. La posibilidad de que una mutación se haya introducido durante el clonaje del inserto en el vector, debe ser considerada. En Gorben, et. al., 2003, se describe la posibilidad de mutaciones en vectores bacmid que puedan repercutir en la expresión final de la proteína recombinante en un sistema Bac-to-Bac. Por esta razón, para investigaciones posteriores, se debe hacer una secuenciación del fragmento amplificado con los primers M13 analizar si existe alguna mutación que impida la traducción correcta de la proteína VP1.

## 8. CONCLUSIONES

- El establecimiento del cultivo celular de la línea Sf9 se realizó con éxito, logrando un cultivo de células en estado de crecimiento logarítmico sin necesidad de complementar el medio con suero fetal bovino ni antibióticos.
- Se estableció un stock con 8 viales de células congeladas en pases inferiores al 12.
- La transfección de células con el agente FectoFly se logró y la comprobación por método de observación de morfología celular fue útil para la identificación de células transfectadas. La infección de células Sf9 fue comprobada mediante PCR y se concluye que estas fueron infectadas con el inserto.
- El análisis de proteínas con electroforesis SDS-PAGE, no fue completamente concluyente, puesto que no se pudo identificar con certeza la banda correspondiente a la proteína VP1.

## 9. RECOMENDACIONES

- Se recomienda hacer una titulación del virus mediante un ensayo de placa, después de la transfección, para determinar la cantidad de partículas virales infectivas que hay en el sobrenadante de la transfección y realizar una infección con concentración conocida del virus.
- Debido a que la secuenciación utilizada para el análisis de VP1 no tuvo la calidad deseada, se recomienda hacer una nueva secuenciación de la región de inserción dentro del bacmid, usando los primers M13 y analizar si existen codones de stop.
- Para la confirmar la identidad de la proteína expresada, se recomienda analizar la unión de esta proteína con anticuerpos específicos contra VP1.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- ATCC. (2010). Cryogenic Storage of Animal Cells. Tech Bulletin, recuperado desde: <http://www.atcc.org/>
- Ávila-Portillo, L., Madero, J., López, C., León, M., Acosta, L., Gómez, C., Delgado, L., Gómez, C., Lozano, J. y Reguero, M. (2006). Fundamentos de criopreservación. *Revista Colombiana* Vol. 57 No. 4. (291-300).
- Chen, Q. (2008). Expression and Purification of Pharmaceutical Proteins in Plants
- Crowther, 1986 Antigenic structure of foot-and-mouth disease virus. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 5 (2), 299-314
- Cultek. (2015). Sistemas de Expresión para la producción de proteínas heterólogas. Recuperado el 2015-01-22 desde la página oficial de Cultek <http://www.cultek.com/>.
- Díaz, E., A. Riviere, A. Rivera y L. del Barrio. (2011). Educación Sanitaria y Abogacía para el control progresivo de la fiebre aftosa en la región andina. *Directrices para el diseño de estrategias*.
- Drago Serrano, ME. Y Sainz Espuñes, T. (2006). Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. Departamento Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco. Volumen 37. No. 1.
- Drago, ME., Sainz, T. (2006). Sistemas de expresión para proteínas terapéuticas recombinantes. Departamento Sistemas Biológicos, UAM-Xochimilco. Volumen 37. No. 1.
- García, M. (2000). Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. *Laboratorios Beterá. Univ Diag*; 1(2):31-41
- Gonzalez, J. y Pérez, J. (Enero, 2005). Clasificación de las Vacunas. Sevilla.
- Gorben, P., Pijlman, J., van Schijndel y Just, M. (2003). Spontaneous excision of BAC vector sequences from bacmid-derived baculovirus expression vectors upon passage in insect cells. Wageningen University, Laboratory of Virology, Binnenhaven 11, 6709 PD, Wageningen, The Netherlands.
- Gotoh T1, Miyazaki Y, Sato W, Kikuchi K, Bentley WE. (2001). Proteolytic activity and recombinant protein production in virus-infected Sf-9 insect cell cultures supplemented with carboxyl and cysteine protease inhibitors. *J Biosci Bioeng*; 92 (3): 248-55.
- Guevara-Hernández, E., López-Zavala, A., Jiménez-Gutiérrez, L., Sotelo-Mundo, R. (2013). Perspectivas actuales del uso de proteínas recombinantes y su importancia en la investigación científica e industrial. *Revista de Ciencias Biológicas y de la Salud. Universidad de Sonora*. Vol.15. No. 3.
- Höhlich, B-J. et al. (2003). Identification of foot-and-mouth disease virus-specific linear B-cell epitopes to differentiate between infected and vaccinated cattle. *Journal of Virology*, 77, 8633 – 8645
- Homeland Security. (2013). A World Free of one of the Most Virulent Animal Diseases? Official website of the Department of Homeland Security. USA.
- Ikonomou L1, Schneider YJ, Agathos SN. (2003). Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol*.
- Invitrogen. (2010). Bac-to-Bac Baculovirus Expression System. Versión F.
- Jayaraj, R. y Smooker, P. (2009). So you Need a Protein - A Guide to the Production of Recombinant Proteins. *The Open Veterinary Science Journal*.
- Kishwar, H. (2013). Gene Expression in Mammalian Cells and its Applications. *Adv Pharm Bull*.

- Li, Z., Yi, Y., Yin, X., Zhang, Z., y Liu, J. (2008). Expression of foot and mouth disease virus capsid proteins in silkworm-baculovirus expression system and its utilization as a subunit vaccine. *Plos One*. Vol. 3
- Life Technologies a. (2015). Gibco® Cell Culture Basics Homepage. Morphology of Sf9 Cells.
- Ma, Li-na; Jie Zhang, Hao-tai Chen, Jian-hua Zhou, Yao-zhong Ding y Yong-sheng Liu. (2011). An overview on ELISA techniques for FMD. *Virology Journal*. Vol. 8: 419.
- Moo-Young, M., L.A. Babiuk, y J.P. Phillips. (1989). *Animal Biotechnology: Comprehensive Biotechnology, First Supplement*. Pergamon Press
- Nagarajan, G., Jumar, C., Dechamma, H., Reddy, G., Ganesh, K., Suryanarayana, V. (2008). Cloning and expression of FMDV-VP1 immunoreactive peptide in trivalent form and its application as immunogen. Indian Veterinary Research Institute, Bangalore, India.
- Novagen. (2002). Sf9 Insect cells. CN Biosciences, Inc., an affiliate of Merck KGaA, Darmstadt, Germany
- OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal. (Mayo, 2014). Lista de los Países Miembros libres de fiebre aftosa.
- OMS. (2015). Temas de Salud: Vacunas. Recuperado el 2015-01-23 desde la página oficial de la OMS <http://www.who.int/topics/vaccines/es/>
- OPS. (2011). Situación de los programas de erradicación de la fiebre aftosa. Informe situación de los países.
- Palacios, D. y Andrade, P. (2011). Detección Molecular del Virus de la Fiebre Aftosa en Muestras de Ganado Infectado y Utilización del Sistema Bac to Bac para la Construcción de Baculovirus Recombinantes con Genes Inmunogénicos. *Avances en Ciencias e Ingenierías*. USFQ.
- Pharmaquest. (2008). Biovet plans to launch Asia's first BSL-4 production plant for FMD vaccine. Recuperado el 2015-01-11 desde <http://www.pharmaquest.biz/>
- Polyplus. (2013). FectoFly® in vitro nucleic acid transfection reagent protocol.
- Pontén F, Gry M, Fagerberg L, Lundberg E, Asplund A, Berglund L, Oksvold P, Björling E, Hober S, Kampf C, Navani S, Nilsson P, Ottosson J, Persson A, Wernérus H, Wester K, Uhlén M. (2009). A global view of protein expression in human cells, tissues, and organs. *Mol Syst Biol*. 5:337.
- Rendic, I., Wilson, H., Paschinger, K. (2007). The Glycosylation Capacity of Insect Cells. *Croat. Chem. Acta* 81 (1) 7–21.
- Rodríguez, LL y Grubman, LJ. (2009). Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine*.
- Rueckert, R. R. 1996. Picornaviridae: the viruses and their replication, p. 609-654. En B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. H. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
- Ruiz-Bravo, A. (2001). El virus de la fiebre aftosa. *Ars Pharmaceutica*. Departamento de Microbiología. Universidad de Granada.
- Sani Vademecum Veterinario. (2004). Bioaftogén. Recuperado el día 2015-01-02 desde <http://www.sani.com.ar/>
- Simpson, R. (2007). *Staining Proteins in Gels with Silver Nitrate*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA.
- Sodoyer, R. (2004). *Expression Systems for the Production on Recombinant Pharmaceuticals*. Technology Review.
- Stacey, G y Possee, R. (1996). Safety aspects of insect cell culture. *Cytotechnology*. Volume 20, Issue 1-3, pp 299-304



- Terpe, K. (2006). Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol Biotechnol.* Springer.
- Thiem, S. y Cheng, X. (2009). Baculovirus Host-Range. *Virología sónica.* 24. (5): 436-457
- Van Oers, M. (2006). Vaccines for viral and parasitic diseases produced with baculovirus. *Advances in virus Research.* Vol. 68. The Netherlands.
- Vitrocell. (2009). Medios de Cultivo Celular. Recuperado desde:  
<http://www.vitrocell.com.br/>
- Walsh, G. (2005). Biopharmaceuticals: recent approvals and likely directions. *Trends Biotechnol.* 23(11):553-8
- Wells, J., Wilson, P., Norton, PM., Le Page, RW. (1993). A model system for the investigation of heterologous protein secretion pathways in *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* No. 59 Vol. 11: 3954-9.
- Wildt, S y Gerngross, T. (2005). The humanization of N-glycosylation pathways in yeast. *Nature Reviews Microbiology* 3, 119-128.

## 11. TABLAS

**Tabla 1:** Cálculo de la cantidad de FectoFly a usar para la transfección

Muestra	Concentración de la muestra	Cantidad a usar para 9µl de FectoFly
Bacmid	2,4 µg/µl	9 µl
bacmid + VP1-2	740 ng/µl	12,6 µl
bacmid + VP1-5	2,5 µg/µl	3,6 µl

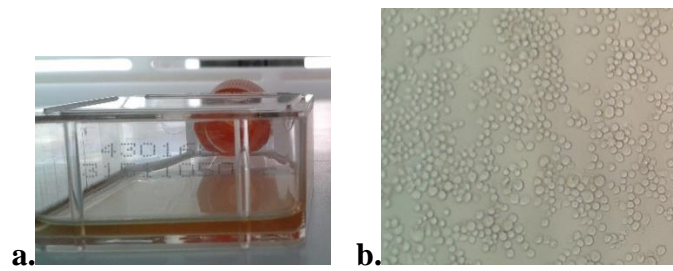
**Tabla 2:** Preparación del master mix para amplificación por PCR de VP1

Reactivo	Volumen para 1 muestra (µl)
Agua para PCR	16,55
Buffer de reacción 10X Invitrogen Brasil	2,5
Primer F 10µM	1,25
Primer R 10µM	1,25
MgCl <sub>2</sub> 50mM Invitrogen Brasil	0,75
dNTPs 100mM	0,5
Taq Polimerasa 5U/µl	0,2

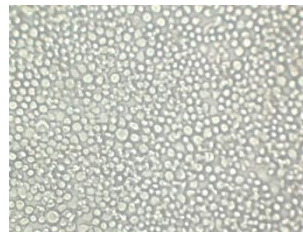
**Tabla 3:** Condiciones para la amplificación por PCR de VP1

	Temperatura	Tiempo	
<b>Desnaturalización inicial</b>	95°C	2 min	30 ciclos
<b>Desnaturalización</b>	95°C	15 seg	
<b>Annealing</b>	60°C	15 seg	
	55°C	15 seg	
<b>Extensión</b>	72°C	1 min	
<b>Extensión final</b>	72°C	7 min	

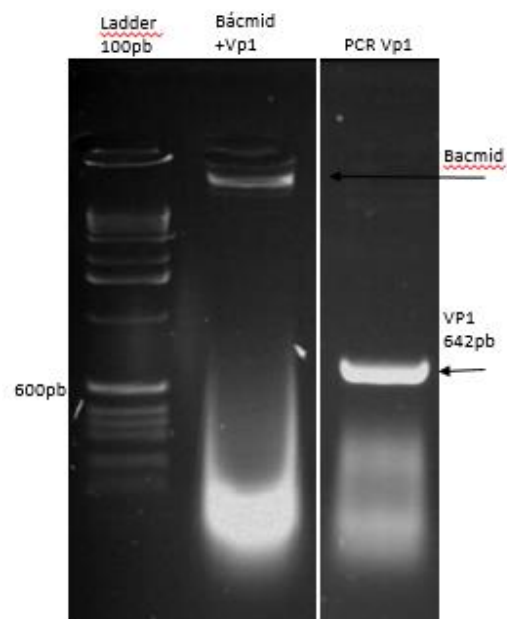
## 12. FIGURAS



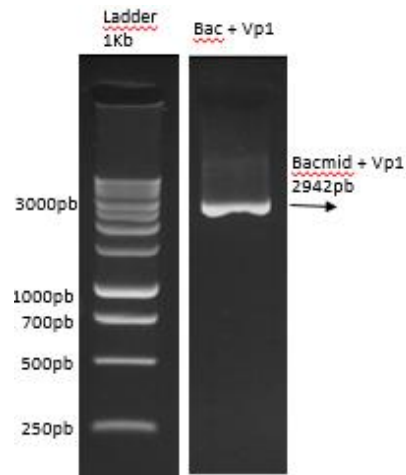
**Figura 1:** a. Flask T-25 para el crecimiento de las células Sf9 con 4ml de medio de cultivo.  
b. Células Sf9 crecidas en monocapa.



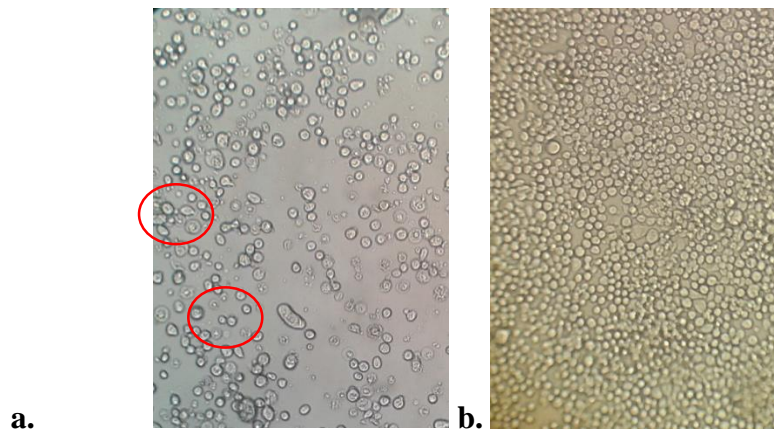
**Figura 2:** Células Sf9 que han alcanzado el 100% de confluencia en el crecimiento en monocapa.



**Figura 3:** Extracción de bacmid y verificación de la presencia de VP1



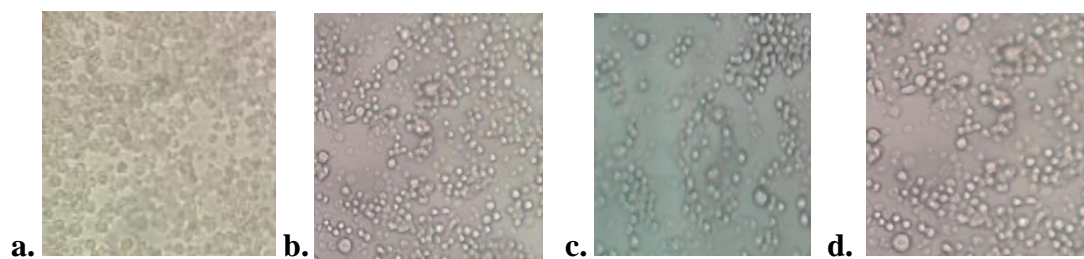
**Figura 4:** PCR confirmatorio de la inserción de VP1 en el lugar correcto del bacmid.



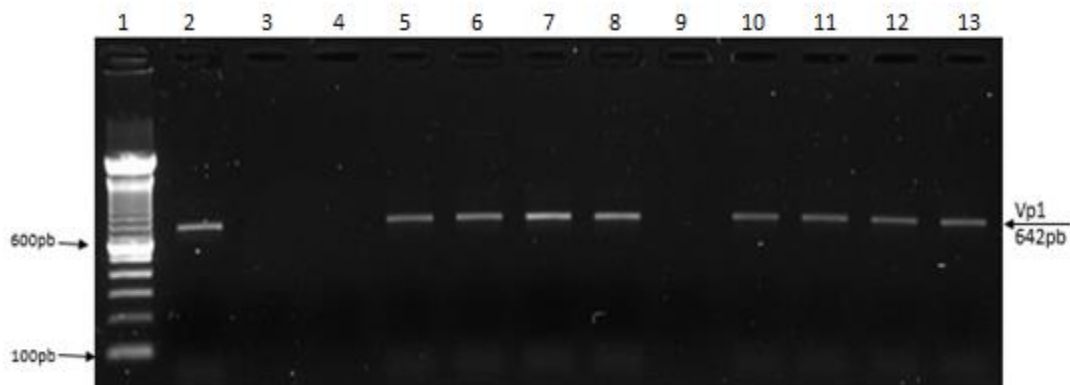
**Figura 5:** Comparación morfológica de las células transfectadas VS las no transfectadas.

a. Células transfectadas 48h post-transfección.

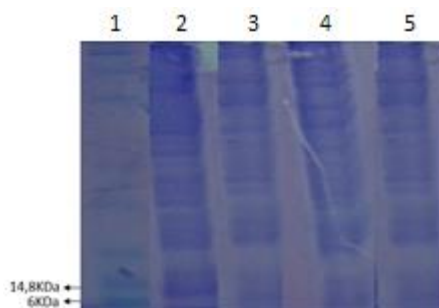
b. Mock- control negativo: Células no transfectadas 48h.



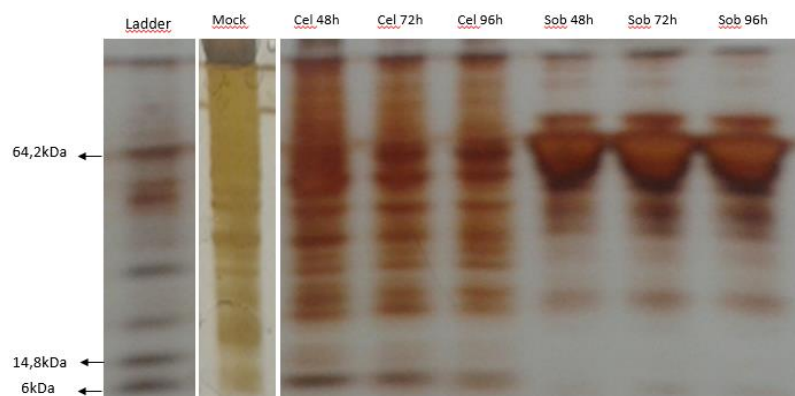
**Figura 6:** Comparación morfológica de células infectadas. Células Sf9 infectadas luego de: a. 24 horas, b. 48 horas, c. 72 horas y d. 96 horas.



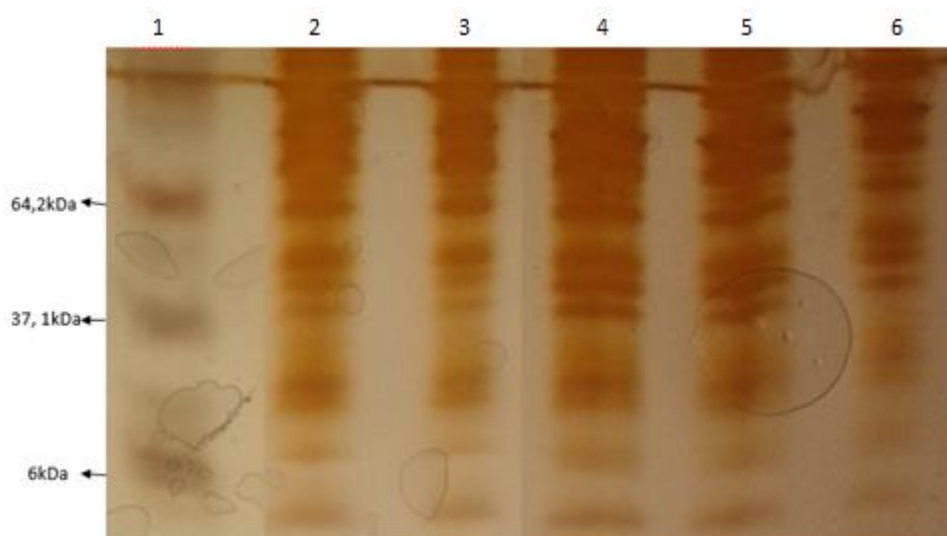
**Figura 7:** PCR de VP1 en muestras de células y sobrenadantes. Orden de carga de pocillos de izquierda aderecha: 1) Ladder 100pb Invitrogen, 2) Control positivo, 3) Control negativo, 4) Mock células, 5) Células luego de 24h de infección, 6) Células luego de 48h de infección, 7) Células luego de 72h de infección, 8) Células luego de 96h de infección, 9) Mock sobrenadante, 10) Sobrenadante luego de 24h de infección, 11) Sobrenadante luego de 48h de infección, 12) Sobrenadante luego de 72h de infección, 13) Sobrenadante luego de 96h de infección.



**Figura 8:** SDS-PAGE de células cultivadas en medio SF-9000 con FBS, con tinción de azul de coomasie. Muestras de los pocillos de izquierda a derecha: 1) Benchmark protein ladder (7ul), 2) Células MOCK, 3) Células 24 horas postinfección, 4) Células 48 horas postinfección, 5) Células 72 horas postinfección, 6) Células t 96 horas postinfección



**Figura 9:** SDS-PAGE de células cultivadas en medio SF-9000 con FBS con tinción de nitrato de plata. Muestras de los pocillos de izquierda a derecha: 1) Benchmark protein ladder (7ul), 2) Células MOCK, 3) Células 48 horas postinfección, 4) Células 72 horas postinfección, 5) Células 96 horas postinfección, 6) Sobrenadante 48h post transfección, 7) Sobrenadante 72h post transfección, 8) Sobrenadante 96h post transfección



**Figura 10:** SDS-PAGE de células cultivadas en medio ESF-921 sin proteínas, con tinción de nitrato de plata. Muestras de los pocillos de izquierda a derecha: 1) Benchmark protein ladder (7ul), 2) Células MOCK, 3) Células 24 horas postinfección, 4) Células 48 horas postinfección, 5) Células 72 horas postinfección, 6) Células 96 horas postinfección



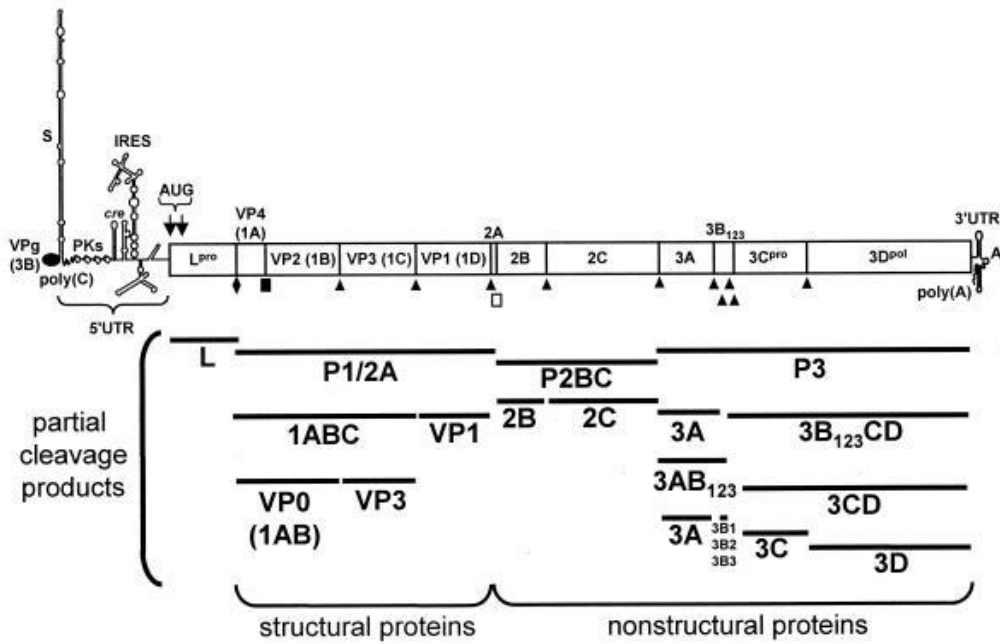
**Figura 11:** SDS-PAGE de sobrenadantes con tinción de nitrato de plata. Muestras de los pocillos de izquierda a derecha: 1) Benchmark protein ladder (7ul), 2) Sobrenadante MOCK, 3) Sobrenadante 24 horas postinfección, 4) Sobrenadante 48 horas postinfección, 5) Sobrenadante 72 horas postinfección, 6) Sobrenadante 96 horas postinfección.

## 13. ANEXOS

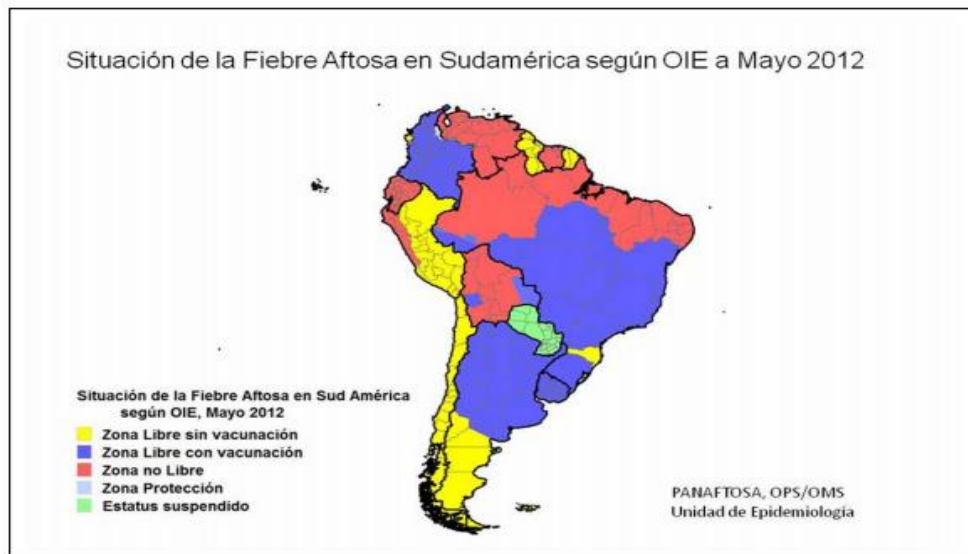
Antigen	Antibody Type	Pharmaceutical Target	Host Plant	Reference
Streptococcal surface antigen SA I/II	Secretory IgA/G	Tooth decay	<i>N. tabacum</i>	Ma et al., 1995
Herpes simplex virus 2 glycoprotein B	IgG	Microbicide for genital herpes	<i>G. max</i> <i>O. sativa</i>	Zeitlin et al., 1998a; Zeitlin et al., 1998b
Tobacco mosaic virus coat proteins	Bispecific scFv	Model bispecific -scFv molecule	<i>N. tabacum</i>	Fischer et al., 1999
Human creatine kinase-MM	Fab	Neurone and rheumatic diseases	<i>A. thaliana</i>	Peeters et al., 2001
Human carcinoembryonic antigen (CEA)	Diabody	Tumor imaging for colorectal, lung, breast, and pancreatic carcinomas	<i>N. tabacum</i>	Vaquero et al., 2002
Human rhesus D	IgG1	Alloimmunization, haemolytic disease of newborn	<i>A. thaliana</i>	Bouquin et al., 2002
Human chorionic gonadotropin (HCG)	scFv, diabody and IgG1	Diagnostic and therapeutic for HCG-expressing cancers or as contraceptive	<i>N. tabacum</i>	Kathuria et al., 2002
Tumor surface antigen	scFv	Therapeutic vaccine for non-Hodgkin's lymphoma	<i>N. benthamiana</i>	McCormick et al., 2003, 2008
Rabies virus	IgG	Rabies virus	<i>N. tabacum</i>	Ko et al., 2003
Herpes simplex virus glycoprotein D	LS (IgA type)	Genital herpes diagnostics	<i>C. reinhardtii</i>	Mayfield et al., 2003
Human epidermal growth factor receptor	IgG	Therapeutics for refractory colorectal cancer	<i>Z. mays</i> (corn seeds)	Ludwig et al., 2004
Hepatitis B surface antigen	IgG	Hepatitis B virus infections	<i>N. tabacum</i> BY2 cells	Yano et al., 2004
Protective antigen (PA) of <i>Bacillus anthracis</i>	IgG	Therapeutics for anthrax exposure, antiterrorism agent	<i>N. benthamiana</i>	Hull et al., 2005
Lipopolysaccharide (LPS) of <i>S. enterica</i> Paratyphi B	scFv	Salmonella enterica diagnostic and therapeutic	<i>N. tabacum</i>	Makvandi-Nejad et al., 2005
Tumor-associated antigen GA733	IgG	Colorectal carcinomas	<i>N. tabacum</i>	Ko et al., 2005
Human epidermal growth factor receptor HER2	scFv	Diagnostic for breast, ovary, prostate and lung cancer	<i>N. tabacum</i>	Galeffi et al., 2006
Tetanus toxin C fragment	RIC	Vaccine for Tetanus toxin	<i>N. tabacum</i>	Chargelegue et al., 2005
Botulinum toxin A	scFv	Antidote for botulinum toxin A, anti-bioterrorism agent	<i>N. tabacum</i>	Almquist et al., 2006
Tumor-associated antigen	IgG2a	Breast and colorectal cancer	<i>N. tabacum</i>	Brodzik et al., 2006

**Anexo 1:** Anticuerpos de origen recombinante que se producen en la actualidad (Chen, 2008)





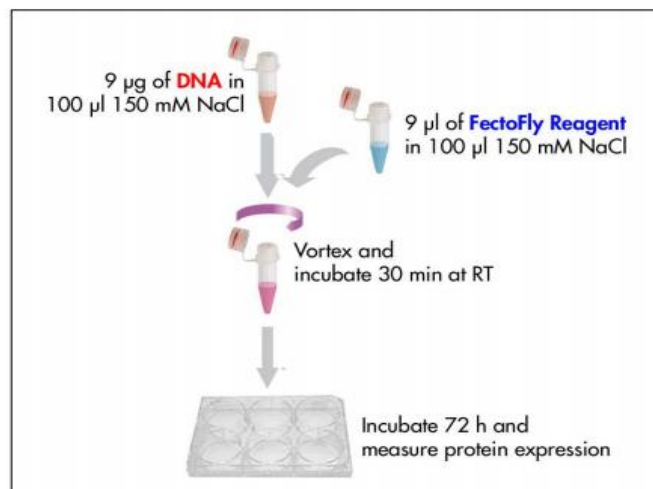
**Anexo 2:** Estructura molecular del virus de la fiebre aftosa (Crowther, 1986)



Fuente: Informe de los países a COSALFA 39.  
Elaboración: Unidad de Epidemiología, PANAFTOSA-OPS/OMS.

**Anexo 3:** Situación de la fiebre aftosa en Sudamérica hasta mayo de 2012

### Protocol for 6-well plates using FectoFly®



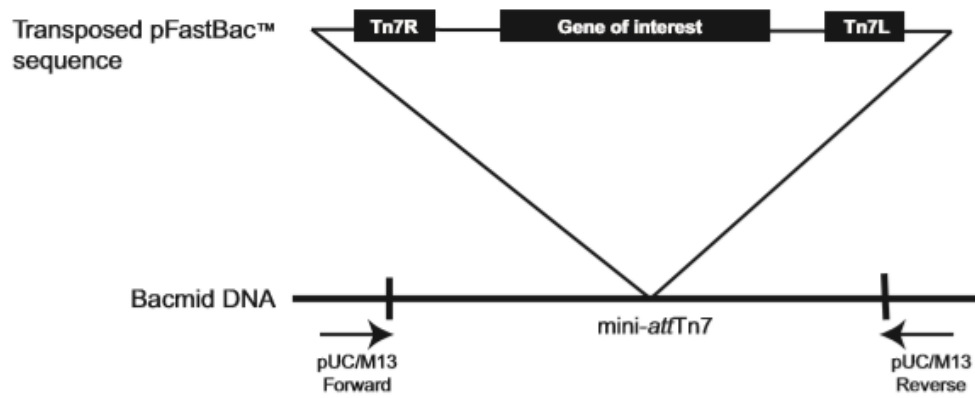
**Anexo 4:** Diagrama de preparación de la solución de transfección con FectoFly (Polyplus, 2013).

Primer	Secuencia del primer	Tamaño del amplicón	Temperatura de annealing
VP1 (Forward)	<b>ataGGATCCaccATGAACCACTTCTGCGGGCGAGT</b>	642 pb	60°C-55°C
Esquema del primer	<b>Nucleótidos extra - Sitio de restricción BamHI - Kozak - Codon de inicio - VP1</b>		
VP1 (Reverse)	<b>cgcAAGCTTTTAAAGTCTGTTTCACCGGTGCCAC</b>	642 pb	60°C-55°C
Esquema del primer	<b>Nucleótidos extra - Sitio de restricción HindIII - Codon de fin- VP1</b>		

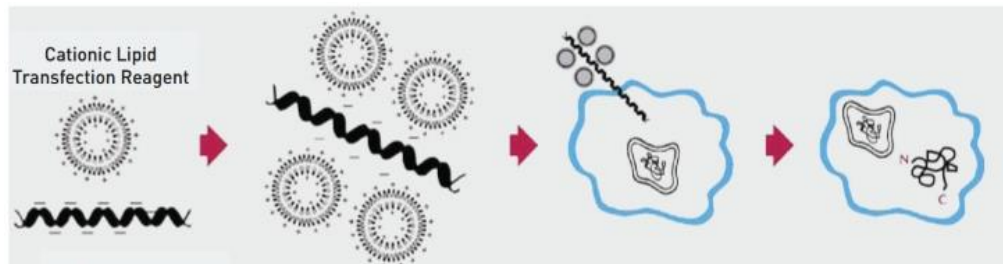
**Anexo 5:** Secuencia de los primers VP1, tomado de Palacios, et. al., 2013.

Primer	Sequence
pUC/M13 Forward	5'-CCCAGTCACGACGTTGTAAAACG-3'
pUC/M13 Reverse	5'-AGCGGATAACAATTCACACAGG-3'

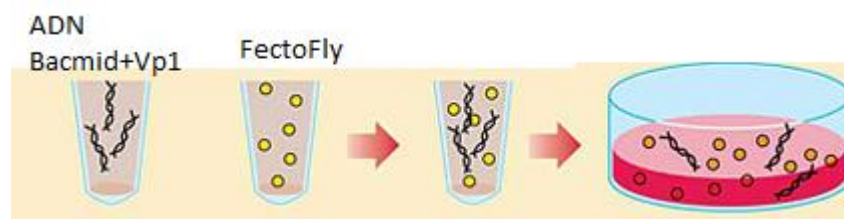
**Anexo 6:** Secuencia de los primers M13 (Invitrogen, 2010)



**Anexo 7:** Segmento amplificado con los primers M13 (Invitrogen, 2010)



**Anexo 8:** Diagrama de ingreso de ADN foráneo en una célula mediante lipofección (Modificado de Sodoyer, 2004)



**Anexo 9:** Diagrama de preparación de FectoFly y ADN para la transfección celular (Modificado de Sodoyer, 2004)