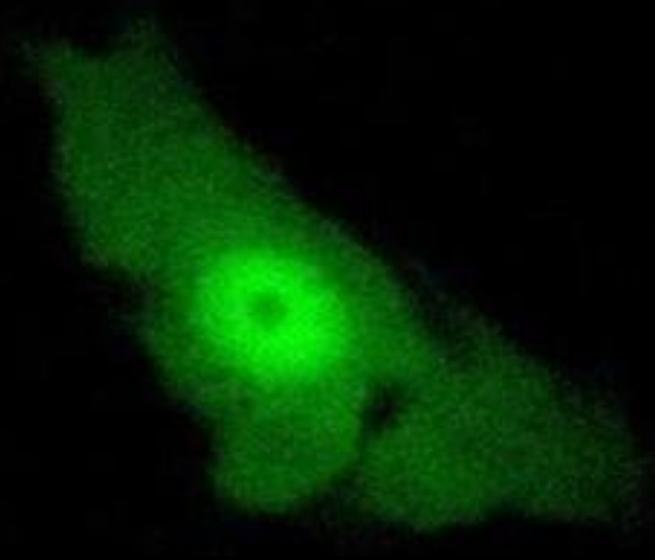


TRABAJO FINAL DE GRADO
LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
PROFUNDIZACIÓN MICROBIOLOGÍA



**ESTUDIO DE LA PRODUCCIÓN DE VECTORES
DEL VIRUS HERPES SIMPLE 1 TIPO AMPLICÓN**

SEBASTIAN VIGO

Orientadora: Dra. Mabel Berois
Co-Orientadora: Dra. Andrea Villarino

2022

ÍNDICE

RESUMEN	4
1 - INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 - Biología del Virus Herpes Simple tipo 1	5
1.2 - El Virus Herpes Simple tipo 1 como vector viral	8
1.3 - Vectores HSV-1 tipo amplicón	10
1.4 - Aplicaciones de los vectores HSV-1 tipo amplicón	13
2 - HIPÓTESIS.....	19
3 - OBJETIVO GENERAL	19
Objetivos específicos.....	19
4 - MATERIALES Y METODOS	20
4.1 - Material Biológico	20
<i>Ácidos Nucleicos</i>	20
<i>Bacterias</i>	21
<i>Células eucariotas</i>	21
4.2 - Producción de los vectores HSV-1 tipo amplicón	22
<i>Extracción y purificación de pHSV-IRES-EGFP y pEHBICP27 con NucleoBond® Xtra Maxi - Macherey Nagel.</i>	22
<i>Extracción y purificación de los plásmidos pHSV-OH1_{wt}-IRES-EGFP y pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP con el kit Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit, (#K0502, #K0503).</i>	23
<i>Producción de Bácmido fHSV-Δpac-ΔICP27</i>	24
<i>Extracción y purificación con QIAGEN Large-Construct Kit</i>	24
<i>Extracción y purificación con NucleoBond® Xtra Maxi - Macherey Nagel</i>	26
4.3 - Electroforesis en gel de agarosa.	26
4.4 - Transfección de las células Vero 2.2 con los componentes del sistema	27
4.5 - Cosecha de vectores	29
4.6 - Concentración de los vectores HSV-1 tipo amplicón.....	29
Concentración por ultrafiltración.....	30
Concentración por centrifugación a vacío en SpeedVac.	31
4.7 - Titulación de los vectores HSV-1 tipo amplicón.	31

4.8 - Ensayo de viabilidad en células transducidas con los vectores HSV-1 tipo amplicón.	32
5 - RESULTADOS	34
5.1 - Calidad y concentración de los componentes del sistema.	34
<i>Plásmido control pHSV-IRES-EGFP y plásmido auxiliar pEBICP27 purificado con NucleoBond® Xtra Maxi - Macherey Nagel.</i>	34
<i>Plásmidos pHSV-IRES-EGFP-OH1_{wt} y pHSV-IRES-EGFP-OH1_{C112S} purificado con el kit Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit.</i>	35
<i>Bácmido fHSV-Δpac-ΔICP27 purificado con QIAGEN Large-Construct Kit y con NucleoBond® Xtra Maxi - Macherey Nagel.</i>	35
5.2 - Producción y titulación de vectores	37
5.3 - Concentración de las producciones de vectores generadas.	39
266	41
5.4 - Viabilidad en células transducidas con los vectores HSV-1 tipo amplicón previamente concentrados.	42
6 - DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN	44
6.1 - Evaluación de la producción de los vectores HSV-1 tipo amplicón.	44
6.2 - Evaluación de las diferentes estrategias de concentración.	46
6.3 - Evaluación de la viabilidad celular	48
BIBLIOGRAFÍA	49

RESUMEN

El virus del Herpes Simple tipo 1 (HSV-1 por su sigla en inglés) es un virus de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, que incluye virus neurotrópicos patógenos de humanos, como HSV-1, el cual se encuentra presente en más del 60% de la población mundial, y puede reactivarse y causar patologías periféricas.

Un vector viral es un virus modificado que se emplea para entregar material genético exógeno a una célula. Los vectores basados en HSV-1 son vehículos de transferencia génica muy versátiles ya que poseen la capacidad de entregar ADN al núcleo de la mayoría de las células de mamíferos y pueden ser producidos y empaquetados con relativa facilidad. Los vectores de tipo amplicón son partículas de HSV-1 que en lugar de contener el genoma viral llevan un concatémero de ADN plasmídico. En el marco de la línea de investigación sobre fosfatasa de patógenos intracelulares desarrollada en la Facultad de Ciencias, nuestro grupo ha generado partículas de HSV-1 tipo amplicón portando el gen de la fosfatasa OH1 del virus Orf. En el presente trabajo se propuso evaluar el rendimiento durante los procesos de purificación y concentración de los vectores HSV-1 tipo amplicón empleando métodos de ultrafiltración y de centrifugación a vacío. Se produjeron 3 variantes de vectores HSV-1 tipo amplicón uno conteniendo el gen de la proteína OH1 en su variante salvaje, otro con el mutante inactivo de OH1, y por último un vector control que solo expresa el gen reportero de la proteína verde fluorescente EGFP. Se titularon estas producciones antes y después del proceso de concentración observándose mejores resultados concentrando por ultrafiltración y se compararon estos resultados con los obtenidos por el método de centrifugación por colchón de sacarosa empleado previamente en nuestro grupo.

1 - INTRODUCCIÓN

1.1 - Biología del Virus Herpes Simple tipo 1

El virus del Herpes simple 1 (HSV-1) es un virus de la familia *Herpesviridae*, subfamilia *Alphaherpesvirinae*, que consiste en un subconjunto de virus neurotrópicos que incluyen patógenos humanos comunes, como HSV-1, HSV-2 y varicela-zóster. Dentro de esta subfamilia HSV-1 pertenece al género *Simplexvirus*.

Los miembros de la familia *Herpesviridae* comparten cuatro propiedades biológicas importantes:

- 1- Poseen un amplio repertorio de enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos nucleicos (por ejemplo, timidina quinasa, timidilato sintasa, dUTPasa, ribonucleótido reductasa), síntesis de ADN (ADN polimerasa, helicasa, primasa), y procesamiento de proteínas. Aunque el arreglo de estas enzimas puede variar de un herpes virus a otro.
- 2- La transcripción de los genes virales, la síntesis de ADN y el ensamblaje de la nucleocápside ocurren en el núcleo. La mayoría adquieren su tegumento y la envoltura en el citoplasma.
- 3- La producción de progenie infecciosa (ciclo lítico) es acompañada por la destrucción de la célula infectada.
- 4- Los herpesvirus estudiados hasta el momento emplean la latencia celular como mecanismo para una persistencia permanente en el huésped (1).

HSV-1 se encuentra presente en más del 60% de la población mundial, y puede reactivarse y causar patologías periféricas como irritaciones o infecciones oculares que pueden derivar en Queratitis Herpética (1). Los virus de Herpes simple tipo 1 son además patógenos neurotrópicos, que pueden permanecer latentes luego de la infección de neuronas sensoriales periféricas del hospedero. Si la infección es en mucosas faciales, puede establecerse una infección en las neuronas del ganglio trigeminal. Bajo ciertas circunstancias

HSV-1 puede migrar al sistema nervioso central y causar encefalitis con resultados devastadores (2). Se trata de un virus envuelto, con glicoproteínas de superficie que intervienen en la unión virus-célula, la fusión de membranas y el ingreso del virión (Figura 1 A y B). Su tamaño es de unos 190 nm (225 nm si se toman en cuenta las glicoproteínas de superficie) y posee una nucleocápside icosaédrica formada por 162 capsómeros constituidos por 4 proteínas: VP5, VP23, VP26 y VP19C. La cápside está rodeada de una capa denominada tegumento, formado por proteínas virales organizadas de forma irregular, con funciones regulatorias variadas que son liberadas en la célula recién infectada luego de la fusión de membranas. Entre estas proteínas se encuentra VP16, la cual está involucrada en la regulación de genes tempranos del virus (4). Otro ejemplo es VP22, con funciones de estabilización de proteínas que participan del ciclo lítico de HSV-1 (3). La cápside contiene el ADN viral, que es doble-hebra y lineal, con 152 kbp que codifican para unos 80–85 productos funcionales. Está compuesto por dos segmentos denominados segmentos únicos largo y corto (UL y US, respectivamente), los cuales están flanqueados por secuencias repetidas invertidas capaces de formar estructuras terciarias (plegamiento, bucles) que faciliten el empaquetamiento del ADN (Figura 1C) (4).

La infección con HSV-1 se inicia en células epiteliales de superficies mucosas luego de la unión de glicoproteínas virales a receptores en la superficie de estas células (como nectina-1), que estimulan la fusión de las membranas viral y celular. El virus HSV-1 ingresa a la célula de dos formas posibles: mediante la fusión de membranas viral-celular, o por endocitosis de la partícula, fusionándose luego la membrana viral con la vesícula. A continuación, las proteínas del tegumento son liberadas en el citosol y la nucleocápside viral es dirigida por los microtúbulos al núcleo celular donde se liberará el genoma viral. En el núcleo, el ADN viral se circulariza y comienzan a transcribirse genes virales tempranos (1). Esta replicación del genoma se da por círculo rodante, donde una de las hebras de la doble hélice se corta mientras que la otra sirve de molde para la generación de múltiples copias en forma de concatémero.

Estas copias monocatenarias son luego complementadas por una enzima polimerasa para dar lugar al genoma viral de doble cadena (1). Luego de la replicación de los componentes virales se da el ensamblaje de la cápside y el empaquetamiento del ADN viral en el núcleo. La encapsidación del ADN viral se da a través de un poro proteico en la cápside formado por la

proteína viral pUL6 (5). Una vez que se ha formado la nucleocápside en el núcleo, la ruta hacia el espacio extracelular es compleja ya que debe atravesar la membrana nuclear. Se han sugerido dos posibles vías para la obtención de la bicapa lipídica que cubre el “core” viral: la envoltura del virión es procesada durante su tránsito por el aparato de Golgi, o es obtenida de la membrana citoplasmática. La lisis celular es un evento tardío durante la infección, donde se liberan las partículas virales maduras (1).

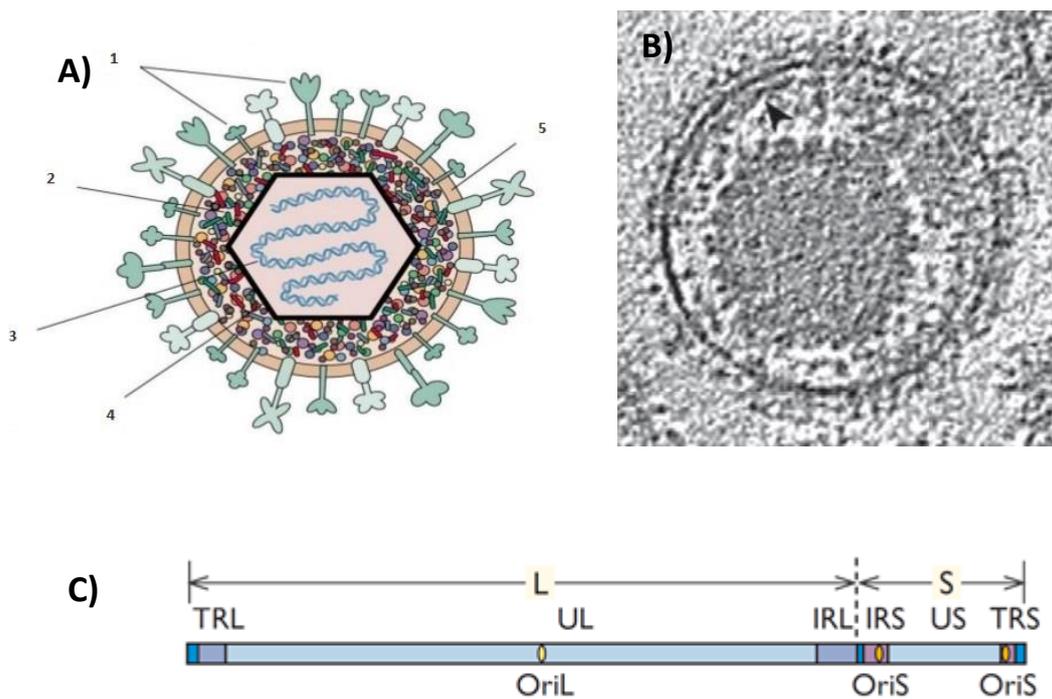


Figura 1. Representación esquemática e imagen 3D del virión de HSV-1. A) Esquema de los componentes de una partícula de HSV-1: 1. Proteínas de membrana. 2. Tegumento. 3. ADN vírico. 4. Nucleocápside. 5. Membrana lipídica. B) Tomografía crioelectrónica de un corte de una única partícula de HSV-1 donde se indica con una flecha la envoltura viral. C) Esquema del ADN viral el cual codifica para 80–85 productos funcionales ubicados en las regiones UL y US del genoma. Posee 3 Orígenes de replicación (*ori*): 2 en US y 1 en UL. Tanto US como UL se encuentran flaqueados por secuencias de repetidos complementarios. Adaptado de referencia (3).

1.2 - El Virus Herpes Simple tipo 1 como vector viral

Un vector viral es un virus modificado que se emplea para entregar material genético exógeno a una célula. Se conoce como transducción a la transferencia de genes mediada por un vector viral y se denominan unidades transductantes a los virus que participan en ello.

La transferencia de genes mediante vectores virales es una forma de entregar ADN a células *in vivo*, y el mayor reto al que se enfrenta esta vía de transferencia es desarrollar sistemas que sean no tóxicos para células y organismos. Los virus son naturalmente muy eficientes entregando material genético propio a células, por eso los vectores virales son una buena opción para la transferencia de genes foráneos a determinados tipos celulares. El problema es que estos vectores pueden desencadenar respuestas inmunitarias en los hospederos, principalmente la respuesta del complemento u otros componentes del sistema inmune innato, así como también estimular la respuesta mediada por anticuerpos preexistentes (6). La elección del vector apropiado para una transferencia génica específica debe considerar varios parámetros como pueden ser los procesos de producción, la necesidad de una expresión a largo o corto plazo y también la regulación de la expresión de dichos genes (7).

Los vectores basados en HSV-1 son vehículos de transferencia génica muy versátiles, poseen la capacidad de entregar cerca de 150 kbp de ADN al núcleo de la mayoría de las células de mamíferos y pueden ser producidos y empaquetados con relativa facilidad. Estos vectores virales poseen algunas características que los vuelven únicos además de la gran capacidad de carga de material genético: i) el ADN no se integra al cromosoma del hospedero, reduciendo la probabilidad de una mutación por inserción, lo que posibilita su uso en terapia génica, ii) la gran complejidad de su genoma incluye unos 40 genes no esenciales para la replicación de la partícula, que pueden ser eliminados/sustituidos sin alterar la producción viral, iii) es capaz de infectar células del sistema nervioso y posee la capacidad de transportarse por el axón en sentido anterógrado y retrógrado. Además, es un vector que crece fácilmente en cultivos pudiendo alcanzar títulos altos (8).

Los vectores derivados de HSV-1 pueden ser de tres tipos (Figura 2):

- i) Vectores atenuados que son virus recombinantes capaces de replicarse pero que contienen mutaciones que restringen su ciclo lítico, u otras funciones. Por ejemplo, HSV - Δ ICP34.5 carece de la habilidad de bloquear la producción de IFN, el cual es generado en respuesta a una infección viral. De cualquier manera, estos virus siguen siendo tóxicos para la célula por lo cual no se recomiendan para entregar material genético.
- ii) Vectores defectivos que son virus recombinantes incapaces de completar un ciclo replicativo por falta de uno o más genes esenciales, pero que mantienen muchas características de un virus salvaje como la capacidad de expresar genes virales. Estos virus son empleados en líneas celulares complementarias, que aporten el/los genes esenciales ausentes en la partícula viral, fuera de estas líneas estos virus no pueden replicarse. Igualmente son virus citotóxicos por portar aún genes que codifican para proteínas virales.
- iii) Vectores de tipo amplicón que no llevan genes virales pero llevan un plásmido amplicon, siendo esta la mejor opción para reducir la citotoxicidad. Además, cuentan con una gran capacidad para almacenar secuencias transgénicas y dependen de vectores auxiliares para su replicación (8)(9)(10)(11)

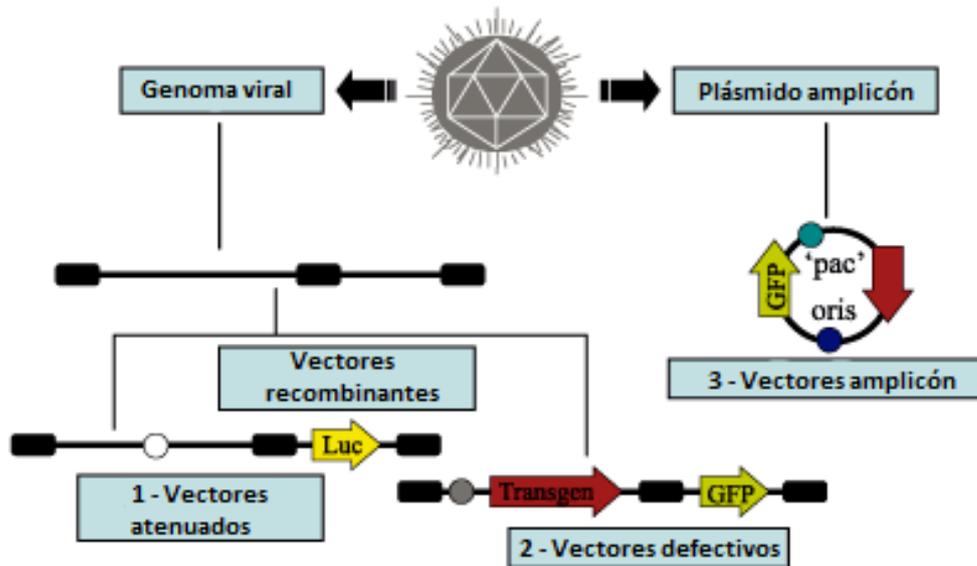


Figura 2. Tres tipos de vectores de HSV-1. Los vectores recombinantes son partículas de HSV-1 que portan un genoma modificado de HSV-1. **1)** Los vectores atenuados poseen en su genoma una mutación en algún gen que afecte la virulencia de la partícula (círculo blanco) y un gen reportero (flecha amarilla – luciferasa). **2)** En los vectores defectivos generalmente existe una deleción en algún gen codificante para alguna función esencial (círculo gris). En el esquema se representa el genoma portando un transgén (flecha roja) y un gen reportero (Flecha verde- *green fluorescent protein*). **3)** Los vectores amplicones son partículas de HSV-1 que portan ADN derivado del plásmido amplicón en lugar del genoma viral. Los amplicones generalmente portan el transgén, un gen reportero, la señal de empaquetamiento (*pac*) de HSV-1 y su origen de replicación (*ori*). Adaptado de referencia (8)

1.3 - Vectores HSV-1 tipo amplicón

Los vectores amplicón son partículas de HSV-1, idénticas al HSV-1 silvestre desde el punto de vista estructural, inmunológico y de rango de huésped, pero en su interior llevan una forma concatémica de ADN plasmídico, llamado plásmido amplicón, en lugar del genoma viral. El ADN plasmídico (plásmido amplicón), es un plásmido de *E. coli* estándar constituido por una unidad transcripcional (*cassette*) con la secuencia transgénica de interés, así como dos secuencias de ADN del genoma de HSV-1: el origen de replicación (*ori*) y una señal de empaquetamiento (*pac*) (Figura 3). Este mecanismo sumado a su gran capacidad de empaquetamiento permite la incorporación de varias copias del plásmido amplicón hasta completar aproximadamente 150 kpb (12). Típicamente para construir los vectores de HSV-1 tipo amplicón se realizaba una transfección con el plásmido amplicón y una infección con un virus auxiliar HSV-1 defectivo por lo cual la producción se realiza en líneas celulares que

transcomplementan el gen viral esencial ausente (Figura 4 A). Este método, si bien permite la formación de HSV-1 tipo amplicón, la producción estará constituida no solo por el vector HSV-1 sino también por el virus HSV-1 auxiliar, lo cual es desventajoso para su uso en terapia génica o protocolos de vacunación (9)(11). Así, para reducir el problema de contaminación por virus auxiliar se desarrolló un sistema de empaquetamiento que utiliza la transfección múltiple de un plásmido amplicón (que contiene el *cassette* para la expresión del gen foráneo a ser encapsulado) con un juego de cinco cósmidos que contienen de forma solapada el genoma de HSV-1, pero carece de la señal *pac* (Figura 4 B). El genoma aporta las funciones de HSV-1 necesarias para la construcción de los vectores. La señal de empaquetamiento *pac* solo se encuentra en el plásmido amplicón, lo que resulta en la producción de partículas virales de tipo amplicón. Este sistema genera stock de vectores HSV-1 amplicón con baja contaminación por virus auxiliar, pero al estar basado en transfección no permite la posterior amplificación de los vectores por lo que los hace inútiles para su uso en producción a gran escala (12) (13). Dicho sistema fue luego refinado a un modo más eficiente y seguro, donde se sustituyeron los cinco cósmidos por un cromosoma bacteriano artificial (BAC por su sigla en inglés) o bácmido el cual contiene el genoma de HSV-1 con la delección del gen esencial ICP27 con un rol importante en la transcripción de genes tempranos, y de la señal de empaquetamiento fSV- Δ pac- Δ ICP27 (Figura 4 C) (12) (13). El BAC además posee un tamaño mucho mayor al del genoma de HSV-1, el cual contribuye (junto a la falta de la señal *pac*) a que no se empaquete en los vectores. La producción del vector amplicón en una línea celular que exprese ICP27 como Vero 2.2 (y/o la adición de éste en un plásmido auxiliar), resulta en una reducción de la contaminación con vectores que no contienen el plásmido amplicón (12)(14). Dicho sistema se utilizó en el presente trabajo.

Existe en la actualidad un nuevo sistema basado en recombinación específica de genes mediante Cre/Lox, donde se emplea un virus auxiliar (HSV-1La Δ J) cuya señal de empaquetamiento *pac* está flanqueada por sitios Lox. Estos sitios son pueden ser recombinados por una enzima llamada Cre. Dependiendo de la orientación del repetido, la secuencia flanqueada por estos puede ser invertida, eliminada o reemplazada. Usando una línea celular complementaria que exprese Cre, se elimina *pac* del virus auxiliar y se evita la contaminación con vectores auxiliares, reduciéndola a menos de 0,2%. Este sistema además permite la producción a gran escala por estar basado en infección, lo que permite amplificar las partículas virales directamente (13).

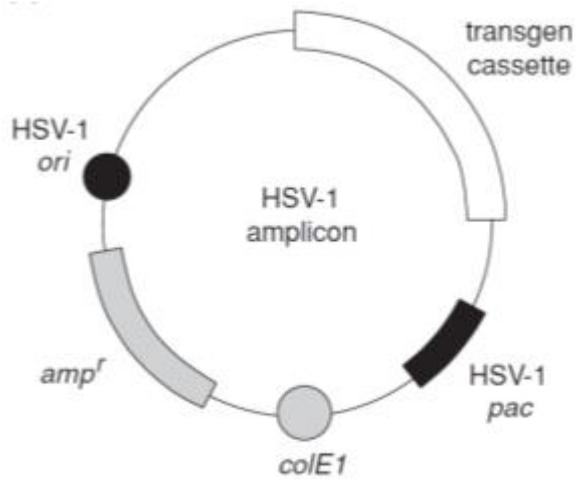


Figura 3. Plásmido amplicón HSV1. *ori*: origen de la replicación de HSV-1. *amp^r*: gen de resistencia a antibiótico usado para su propagación en cultivos bacterianos. *ColE1*: origen de replicación bacteriano. HSV-1 *pac*: señal de empaquetamiento de HSV-1; *transgene cassette*: sitio de inserción de los genes de interés y del gen reportero. Adaptado de referencia (14).

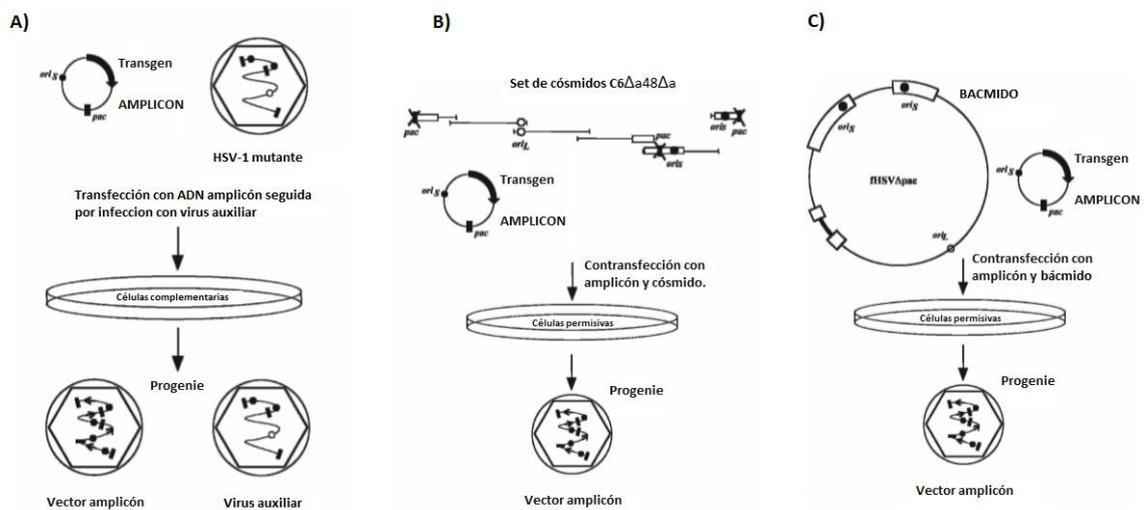


Figura 4. Sistemas de empaquetamiento de ADN amplicón. **A)** Sistema dependiente de virus auxiliar. Células que complementan al mutante defectivo son transfectadas con el ADN amplicón y luego infectadas con virus auxiliar. El stock de vectores consiste en vectores amplicón y virus auxiliar. **B)** Sistema basado en set de cósmidos, y por lo tanto libre de virus auxiliar. **C)** Sistema BAC en el cual se reemplaza el set de cósmidos por un cromosoma artificial bacteriano (BAC). El sistema BAC empleado por nuestro grupo de trabajo carece del gen esencial ICP27, un plásmido extra conteniendo el gen es empleado en la transfección junto al amplicón y al bÁcmido en adición al uso de una línea celular complementaria. Adicionalmente la línea celular trans-complementa dicho gen. Adaptado de referencia (12).

1.4 - Aplicaciones de los vectores HSV-1 tipo amplicón

Los vectores HSV-1 tipo amplicon han sido ampliamente utilizados, para expresar genes de interés inmunológico y neurobiológico, en aplicaciones terapéuticas con resultados satisfactorios. Por ejemplo, estos se han utilizado para la expresión de genes inmunoestimulantes en líneas celulares del glioma y para entregar neurotrofinas, genes anti-apoptóticos o enzimas antioxidantes como intentos de proteger a las neuronas de una variedad de patologías neurológicas (8). Otro ejemplo lo constituye, su utilización en la entrega de tirosina hidroxilasa al sistema nigroestriado, enzima involucrada en la síntesis de un precursor de la dopamina, con la finalidad de tratar la enfermedad de Parkinson (9). Se han empleado también vectores HSV-1 tipo amplicón en la entrega de genes a células de músculo esquelético, mioblastos y miotubos. El análisis de la estructura y función del receptor 1 de rianodina RYR-1 en células musculares era difícil debido a la baja eficiencia de transfección de las técnicas empleadas hasta el momento. Esta proteína participa en el transporte de iones de calcio durante la contracción muscular, por lo que es necesario un estudio *in vivo* para entender mejor su funcionamiento. Mediante la inserción del cDNA de RYR-1 en un vector amplicon de HSV-1, fue posible la expresión de dicha proteína en células musculares de ratón (C57BL10) en altas cantidades y con un buen rendimiento, donde el 70-90 % de las células transfectadas (con una multiplicidad de infección o MOI de 5) expresaron el producto. En este caso la estrategia empleada para la construcción del stock de vectores libre de virus auxiliar fue basada en co-transfección del amplicon con un set de cósmidos que representa el genoma de HSV-1 (15).

Estos vectores virales también son candidatos prometedores para ser aplicados en la formulación de vacunas por su gran capacidad empaquetamiento de material genético ya que incorporan varias copias de plásmido amplicón, lo que incrementa la “dosis” genética entregada (16). Así, puede ser empleado en la expresión de varios genes virales distintos, por ejemplo, en la síntesis mediada por estos vectores virales del set completo de proteínas estructurales que permitan la formación de partículas similares a virus (“virus-like particles” VLPs). Las VLPs son buenos inmunógenos porque representan los antígenos virales en su conformación natural, lo que aumenta el número de anticuerpos neutralizantes generados (16) (17). Un ejemplo de aplicación de este tipo de vectores para expresar VLPs se realizó para

ensayar un modelo alternativo de vacuna para Rotavirus. Empleando vectores HSV-1 tipo amplicon para expresar tres proteínas estructurales como plataforma para impulsar la producción de partículas similares a Rotavirus RVLPs (“rotavirus-like particles”) en las células de mamífero infectadas por los vectores virales (18). En este estudio, en el cual participaron integrantes de nuestro equipo de investigación, se demostró la expresión eficiente de distintos genes estructurales de Rotavirus a partir de un único vector HSV-1 tipo amplicon policistrónico que producen RVLPs. Estas RVLPs inducen en ratones una respuesta inmune humoral específica para Rotavirus y una protección parcial cuando es desafiado con una cepa de Rotavirus salvaje. Además el uso del sistema de HSV-1 tipo amplicón para impulsar la producción de VLPs heterólogas proporciona ventajas desde varias perspectivas: (i) tiempos y costos de la purificación de VLPs; (ii) la entrega de genes codificantes a las células en lugar de la inyección de las VLPs puede llegar a inducir respuestas inmunes más potentes, ya que la producción en el citoplasma de las VLPs imita aquella que resulta de una infección viral; (iii) las proteínas estructurales de HSV-1 proporcionadas por el vector pueden potenciar la respuesta inmune actuando como adyuvante (18).

En Uruguay el trabajo con este tipo de vectores HSV1- tipo amplicón presenta importantes antecedentes. El sistema de vectores HSV-1 tipo amplicón se utilizó para expresar dos variantes (salvaje y truncada) de la glicoproteína D (gD) de membrana del virus de Herpes Bovino tipo 1, que produce la enfermedad rinotraqueitis bovina infecciosa (IBR en inglés). La gD salvaje posee intacta la región transmembrana por lo que se expresará como proteína de membrana en células infectadas con el vector correspondiente, mientras que la variante truncada será secretada por las células (19). El objetivo de emplear estos vectores virales fue aumentar la eficiencia en la entrega del antígeno con respecto a las vacunas de virus inactivados usadas hasta el momento. La capacidad de los vectores de producir una respuesta inmune fue evaluada en ratones, donde se observó un mayor título de anticuerpos en aquellos infectados con el vector que porta la gD sin su región transmembrana, lo que indica una secreción exitosa de la proteína que aumenta la respuesta humoral. Estos resultados sugerirían que los vectores HSV-1 tipo amplicón podrían ser buenos candidatos para generar vacunas en base a vectores contra IBR (19).

Por otro lado, en el marco de una línea de investigación sobre fosfatasa de patógenos intracelulares, nuestro grupo de trabajo ha generado partículas de HSV-1 tipo amplicón portando el gen de la fosfatasa OH1 del virus Orf con el fin de validar potenciales interactores de OH1 a nivel celular. El virus Orf pertenece a la familia *Poxviridae*, subfamilia *Chordopoxvirinae* y género *Parapoxvirus*. Se caracterizan por tener una forma ovoide, son virus envueltos de aproximadamente 260 nm de largo por 160 nm de ancho, cubiertos por unas estructuras proteicas alargadas que rodean a toda la partícula asemejándola a un ovillo (20) (Figura 5 A). La infección se da en aquellas zonas donde se ha perdido la integridad del tejido epitelial y puede conducir al Ectima contagioso que afecta principalmente a ovino y caprinos (Figura 5 C). Además, el virus Orf es un patógeno zoonótico, por lo que puede afectar también a humanos (Figura 5 B), siendo las poblaciones de riesgo aquellas que están en contacto directo con animales o con el patógeno (20)(21)(22).

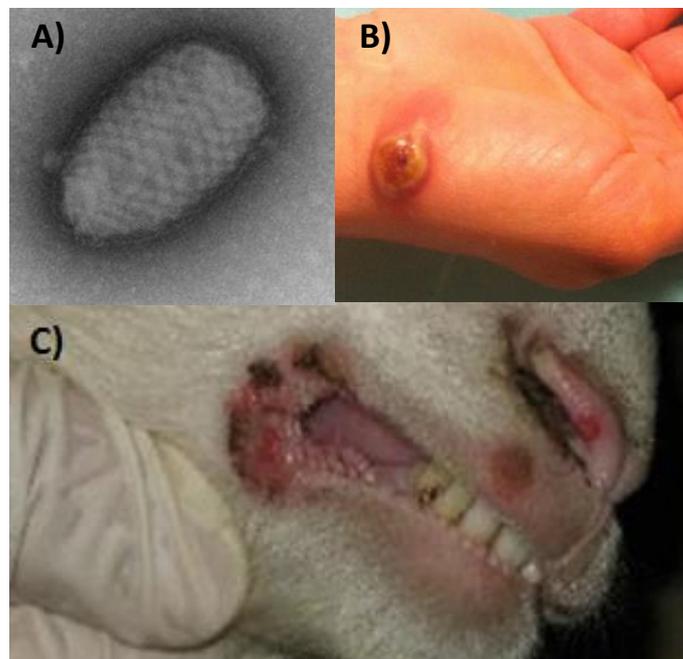


Figura 5. A) Microscopía electrónica que muestra tamaño y forma de las partículas virales (250 nm de largo, 150 nm de ancho) con entramado en zigzag que se asemeja a un ovillo. La barra blanca representa 100 nm. **B)** Infección con virus Orf en personas que faenaron corderos como parte de una práctica religiosa en Marsella, Francia en 2011. Se observan lesiones cutáneas en manos de los pacientes. **C)** Oveja mostrando múltiples lesiones en la comisura de los labios. Adaptado de referencias (21) y (22)

Existe un número importante de genes del virus Orf cuyos productos tienen la función de manipular la respuesta antiviral en el ambiente intra y extracelular de la célula hospedera. Algunas de estas proteínas inmunomoduladoras pueden ser factores anti-apoptóticos, factores de modulación de NF- κ B (factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas), también proteínas con actividad anti-interferón que bloquean/capturan o inhiben la producción de citoquinas. En este último grupo, se pueden destacar a OVIFNR (proteína de resistencia al interferón ovina), expresada tempranamente en el ciclo viral y capaz de detener la producción de interferón tipo I por parte de la célula infectada, y a la interleuquina OV-IL-10 relevante en la modulación de la respuesta inmune al inhibir la producción de citoquinas por los macrófagos y la maduración de células presentadoras de antígenos (20). Por otro lado, nuestro grupo se ha enfocado en el estudio de otro de los factores de virulencia del virus Orf: la fosfatasa de fosfo-tirosina OH1. El gen de dicha fosfatasa se encuentra en la región conservada del genoma del virus Orf y es homóloga a la fosfatasa VH1 del Virus *Vaccinia*. OH1 ha sido caracterizada estructural y funcionalmente *in vitro* por nuestro grupo en el marco de la tesis de Maestría de Danilo Segovia, y constituye la primera estructura resuelta de una fosfatasa del género Parapoxvirus (23). Se demostró también *in vitro* que OH1 es una fosfatasa de triple especificidad, capaz de desfosforilar tanto residuos de fosfo-tirosina, fosfo-treonina como también fosfo-inositol fosfatos. A nivel celular, en marco de la tesis de Maestría de Darío Porley, se demostró que la expresión de OH1 en células HeLa (por transfección con plásmidos pHSV) se correspondía con una disminución en la translocación del factor transcripcional STAT1 al núcleo de células inducidas por IFN γ . Frente a una infección viral, esta vía de activación transcripcional por IFN γ desencadena una cascada que resulta en la fosforilación del factor de transcripción STAT1 en la Tyr 701. Por esta vía de señalización, denominada JAK-STAT, se transmite la información recibida a partir de IFN γ , el cual se une a receptores transmembrana específicos. La unión del IFN γ causa un cambio conformacional en el receptor que permite la activación de la quinasas de tirosina JAKs asociadas al receptor. Las JAKs activadas fosforilan primero al receptor, generando sitios de anclaje que permitan reclutar al sustrato STAT1, el cual luego es fosforilado por JAK (24). Una vez fosforilado este dimeriza y es translocado al núcleo donde activa la expresión de genes que median la respuesta antiviral.

En este contexto, para evaluar el rol de OH1 en la vía de activación de STAT1 nuestro grupo generó vectores HSV-1 tipo amplicón portando plásmidos que expresan la fosfatasa OH1 en

su forma salvaje (HSV1-OH1wt-EGFP), y una forma inactiva de la misma denominada OH1_{C112S} (HSV1-OH1_{C112S}-EGFP). Estas variantes de OH1, junto a un vector control (HSV1-EGFP), se utilizaron en ensayos de transducción de células HeLa, en los cuales se observó un bajo número de células transducidas (del orden del 10%). Este bajo porcentaje de transducción podría deberse a la baja MOI utilizada en dichos ensayos debido a que no se contaba con un número suficiente de partículas virales obtenidas luego de concentración por ultracentrifugación en colchón de sacarosa al 25% en PBS. De hecho, en dichos ensayos se obtuvieron títulos post-concentración variables y bajos, de $1-3 \times 10^5$ UT/mL para el vector control HSV1-EGFP, $0.04-1 \times 10^5$ UT/mL para el vector portando el gen de la fosfatasa viral salvaje HSV1-OH1wt-EGFP y de $0.6-1 \times 10^5$ UT/mL para el vector HSV1-OH1_{C112S}-EGFP portando la variante inactiva de la fosfatasa viral. Durante este proceso de concentración por ultracentrifugación en colchón de sacarosa se pierde el 50% de la producción del vector y no se puede mantener totalmente las condiciones de esterilidad, aunque se cuide lo máximo en cada etapa (25). Si bien esta pérdida de vectores ocurre normalmente durante este proceso, es deseable obtener valores de recuperación mayores a los obtenidos y mantener las condiciones de esterilidad. Esto permitiría poder aumentar la MOI previamente utilizada que fue de 1, evaluando si esto resulta en un aumento del porcentaje de células transducidas. En este contexto, se volvió necesaria la optimización del protocolo de concentración de los vectores y la consideración de estrategias alternativas, lo que motivó el presente trabajo de tesis de grado. Una de las estrategias a implementar para la concentración de los vectores es la ultrafiltración a través de membranas semipermeables (con centricones), las cuales permiten el paso diferencial de ciertas moléculas/solutos en base a su peso molecular y el mantenimiento de la esterilidad de las muestras (26). Además, se ensayará concentrar los vectores HSV-1 tipo amplicón mediante centrifugación en vacío (con SpeedVac), procedimiento que ya ha sido aplicado para la concentración de virus desnudos (27).

Por otro lado, en los ensayos previos del grupo, además del bajo % de transducción se observó un estado general de deterioro de las células. Por lo cual, para evaluar una posible citotoxicidad de la transducción, se determinó la viabilidad celular por citometría de flujo en las células transducidas con los tres vectores (HSV1-EGFP, HSV1-OH1wt-EGFP y HSV1-OH1_{C112S}-EGFP). En estos ensayos se observó un aumento del porcentaje de células muertas en la población tratada con los vectores HSV1-OH1wt-EGFP y HSV1-OH1_{C112S}-EGFP, respecto

a las células transducidas con el vector control (HSV1-EGFP) (25). Esto sugeriría que la presencia de OH1 (salvaje o inactiva) afectaría en cierta medida la viabilidad de las células, resultado que se buscará verificar en la presente tesis.

2 - HIPÓTESIS

Se puede mejorar el rendimiento de obtención de los vectores virales HSV-1 tipo amplicón empleando estrategias alternativas de concentración como la ultrafiltración de las partículas a través de membranas semipermeables o la centrifugación en vacío.

Existe una reducción de la viabilidad en las células HeLa transducidas con los vectores HSV-1 tipo amplicón portando el gen de la fosfatasa OH1.

3 - OBJETIVO GENERAL

Optimización del proceso de producción y evaluación de la transducción con los vectores HSV-1 tipo amplicón de interés.

Objetivos específicos

- Producir los vectores HSV-1 tipo amplicón en la línea celular Vero 2.2.
- Aplicar estrategias alternativas de concentración de los vectores virales obtenidos.
- Cuantificar las producciones de vectores HSV-1 tipo amplicón antes y después del proceso de concentración viral.
- Observar la viabilidad de células HeLa y Vero transducidas con los vectores HSV-1 tipo amplicón.

4 - MATERIALES Y METODOS

4.1 - Material Biológico

Ácidos Nucleicos

Para la producción de los vectores HSV-1 tipo amplicón mediante el sistema BAC se requirió de tres componentes que se detallan a continuación:

- Búcmido fHSV- Δ pac- Δ ICP27: cromosoma artificial bacteriano que porta el genoma viral de HSV-1, con deleciones del gen esencial ICP27 y la señal de empaquetamiento (*pac*).
- Plásmido pEHBICP27: Plásmido auxiliar portando el gen de HSV-1 que codifica para la proteína ICP27, que es esencial en el ciclo viral.
- Plásmido pHSV-IRES-EGFP: Plásmido amplicón porta señal de empaquetamiento HSV-1 *pac*, el origen de replicación HSV-1 *ori*, un cassette de expresión con el promotor temprano IE4/5 de HSV-1, seguido del sitio de clonado múltiple, un sitio interno de entrada del ribosoma (IRES) y el gen de la proteína verde fluorescente (EGFP) De este plásmido se usaron tres variantes:
 - pHSV-IRES-EGFP: Control, portando únicamente el gen reportero de la EGFP.
 - pHSV-OH1_{wt}-IRES-EGFP: Plásmido amplicón portando el gen de la proteína viral OH1 en su forma salvaje y el gen de la EGFP
 - pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP: Plásmido amplicón portando el gen de la variante inactiva de la proteína OH1, la cual presenta una sustitución en la cisteína catalítica por serina (C112S) seguido del gen de la EGFP
- Además de los lotes de Búcmido fHSV- Δ pac- Δ ICP27 extraídos durante esta tesina se dispuso de tres lotes de extracciones de dicho Búcmido realizados por D. Porley en su tesis de maestría (26) y por M. Margenat en su tesis de doctorado (28), que también serán usados en los ensayos de transfección múltiple.

Este sistema se encontraba disponible en el laboratorio y fue cedido por el Dr. Fraefel del Instituto de Virología de la Universidad de Zúrich, Suiza, los plásmidos conteniendo en gen de OH1 fueron generados por Darío Porley durante su tesis de Maestría (26).

Bacterias

Clones de *Escherichia coli* DH5 α recombinante conteniendo ya sea los plásmidos amplicones pHSV-IRES-EGFP, Phsv-OH1_{wt}-IRES-EGFP y pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP, el plásmido auxiliar pEHBICP27 o el b́acmido fHSV- Δ pac- Δ ICP27. Las semillas de las diferentes bacterias recombinantes se encontraban almacenadas a -80°C en el laboratorio y fueron empleadas para realizar cultivos a fin de extraer el ADN plasmídico o del b́acmido.

Células eucariotas

- Células Vero: línea celular proveniente de células epiteliales de riñón de mono verde africano (*Chlorocebus* sp.) disponible en el laboratorio.
- Células HeLa: línea celular proveniente de células epiteliales de cuello uterino humano (*Homo sapiens*) con adenocarcinoma disponible en el laboratorio.

Ambas líneas fueron usadas en este trabajo para ensayos de viabilidad celular y titulación de las producciones de partículas virales de HSV-1.

- Células Vero 2.2: Línea derivada de Vero que contiene el gen ICP27 de HSV-1. La replicación viral de HSV-1 es controlada por una cascada de activación transcripcional derivada de la expresión de genes tempranos, especialmente ICP27, la cual es necesaria para la formación de los viriones. Esta línea fue utilizada para la producción de las partículas de HSV-1.

Todas las líneas celulares fueron mantenidas en medio DMEM (*Gibco ThermoFisher Scientific*) con adición de una solución de antibiótico y antimicótico (100 units/mL of penicillin, 100 μ g/mL of streptomycin, and 0.25 μ g/mL of Gibco Amphotericin *Gibco ThermoFisher Scientific*), y 2 mM L-glutamina (*Gibco ThermoFisher Scientific*), en el caso de la línea Vero 2.2 se adiciona Geneticina G418 500 μ g/ml (*Gibco ThermoFisher Scientific*). Para todas las líneas celulares el medio de cultivo fue suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) previa inactivación del complemento durante 1 hora a 56°C. Las células fueron incubadas a 37°C en una atmósfera al 5% de CO₂. Se evaluó el estado de las líneas celulares cada 24 horas, y se

realizaron subcultivos (pasajes de línea) cada 72 a 96 horas aproximadamente. Se observó en cada caso la densidad celular de los cultivos, así como la morfología de las células y el estado del medio para mantenerlas en condiciones óptimas.

4.2 - Producción de los vectores HSV-1 tipo amplicón

Se prepararon cultivos en caldo LB (*Lysogeny Broth*) con el antibiótico adecuado a partir de las diferentes semillas de *E. coli* DH5 α recombinante que portan cada uno de los plásmidos antes mencionados. En este caso se utilizó ampicilina a (50 μ g/mL) ya que los plásmidos amplicón y el plásmido auxiliar portan resistencia a este antibiótico. A partir de dichos cultivos bacterianos se procedió a la extracción y purificación del ADN plasmídico empleando dos sistemas comerciales: el kit *NucleoBond[®] Xtra Maxi - Macherey Nagel* y el kit *Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit*.

Extracción y purificación de pHSV-IRES-EGFP y pEHBICP27 con NucleoBond[®] Xtra Maxi - Macherey Nagel.

Se procedió siguiendo el protocolo descrito por el fabricante, el cual no aporta información sobre la composición de Las soluciones provistas en el kit. Se comenzó por la siembra de *E. coli* DH5 α portando el plásmido de interés en placas de LB agar (15 gr/litro) y ampicilina (50 μ g/mL) y se incubaron por 2 días a 28°C. Para la preparación del pre-cultivo se inoculó un tubo de 4 mL de medio LB/ampicilina con una única colonia fresca obtenida en las placas, se incubó con agitación (200 rpm) a una temperatura de 37 °C durante 8 horas. A partir de este pre-cultivo le lanzó un cultivo de 500 ml de LB/ampicilina de forma tal que el pre-cultivo quedó diluido 1/1000. Se incubó con agitación (200 rpm) a una temperatura de 37 °C durante 16 horas. Para la obtención de las células bacterianas se centrifugó el cultivo por 10 minutos a 4°C a 6.000 xg (equipo *BeckmanJ2-21*). Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento de células en 90 mL de buffer de resuspensión RES + RNase A. Para la lisis celular y liberación del ADN se agregaron 90 mL de buffer de Lisis a la suspensión, se mezcló por inversión del tubo y se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 5 minutos. Luego se agregaron 90 mL de buffer de neutralización NEU a la suspensión e inmediatamente se mezcló el lisado gentilmente por inversión del tubo unas 10 a 15 veces y se Incubo en hielo por 5 minutos. Para el paso de clarificación de la solución se removió el precipitado mediante

centrifugación a 15000 x g durante 25 minutos, este paso es importante porque de quedar precipitado se puede obstruir la columna. Se cargó el sobrenadante el filtro dentro de la columna y se dejó eluir por gravedad. Luego se procedió al lavado del filtro y de la columna con 15 mL de buffer de equilibrio EQU y se descartó el filtro. Se lavó la columna con 45 mL de buffer WASH. Por último, se procedió a eluir el plásmido mediante la adición a la columna de 15 mL de buffer de elución ELU calentado a 65 - 70 °C. Para precipitar el ADN plasmídico se agregaron 10.5 mL de isopropanol (0.7 volúmenes) a temperatura ambiente se mezcló y se dejó reposar por 2 minutos. Se centrifugó a 15000 x g por 30 minutos a 4 °C y se descartó el sobrenadante.

Para el lavado y secado del sedimento se agregaron 5 mL de etanol 70% a temperatura ambiente y se centrifugó a 15000 x g por 5 minutos. Por último, se extrajo el etanol cuidadosamente con una pipeta, se secó el sedimento a temperatura ambiente y se resuspendió en 750 µL de agua miliQ y se incubó a 4°C durante toda la noche. Se realizaron alícuotas de 30 µL que fueron almacenadas a -20 °C.

Extracción y purificación de los plásmidos pHSV-OH1_{wt}-IRES-EGFP y pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP con el kit Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit, (#K0502, #K0503).

Se trabajó según el protocolo de este kit comercial, para el cual la composición de las soluciones no es especificada por el fabricante. Se sembraron placas de agar LB/ampicilina con *E. coli* DH5α portando los plásmidos de interés, se incubaron a 37°C durante 24 horas. Se inocularon 5 tubos por plásmido conteniendo 5 mL LB/ampicilina cada uno con una colonia fresca aislada y se incubaron a 37°C con agitación a 200 rpm, durante 16 horas. Para un cultivo final de aproximadamente 25 mL por cada plásmido. Se usaron 12 mL en cada miniprep. Para la recuperación de las células se centrifugó a 6800 x g durante 10 minutos (*Beckman J2-21*). Se trabajó a temperatura ambiente y todas las rondas de centrifugación se realizaron en *Eppendorf MiniSpin Plus* a 12000 x g. Se resuspendió completamente un volumen de cada sedimento correspondiente a 12 mL de cultivo en 250 µL de solución de resuspensión. Se agregaron 250 µL de solución de lisis y se mezcló completamente por inversión del tubo. A cada tubo se adicionaron 350 µL de Solución de neutralización, se mezcló por inversión y se centrifugó por 5 minutos para bajar los restos celulares y el ADN cromosomal. Se transfirió el sobrenadante a la columna proporcionada por el kit y se centrifugó por 1 minuto, descartando

las eluciones. Se lavó cada columna añadiendo 500 µL Solución de lavado y centrifugando durante 1 minuto, paso que se realizó dos veces. Luego de descartados las eluciones se centrifugó una vez más durante 1 minuto para retirar restos del líquido. Se transfirió cada columna a un microtubo nuevo y se agregaron 50 µL de Buffer de elución (Tris·Cl 10 mM pH 8.5) cuidadosamente al centro de cada una, se incubaron por 2 minutos y se centrifugó por 2 minutos. Se volvieron a transferir las columnas a microtubos limpios y se realizó un lavado con 50 µL extra de Buffer de elución, se incubaron y centrifugaron por 2 minutos. Tanto la primera elución como la segunda se almacenaron a -20°C. Los plásmidos purificados tanto por maxiprep como por miniprep fueron cuantificados por *NanoDrop™ Lite Spectrophotometer Thermo Scientific* y evaluados por electroforesis en gel de agarosa 1%.

Producción de Bácmido fHSV-Δpac-ΔICP27

A partir de la semilla bacteriana de *E. coli* DH5α conteniendo dicho BAC disponible en el laboratorio y conservada a -80°C en 20% de glicerol (5) se realizaron cultivos de LB/Cloranfenicol, para luego extraer el ADN bacmídico empleando los kits *QIAGEN Large-Construct Kit* y *NucleoBond® Xtra Maxi - Macherey Nagel*, siendo este último el mismo que se usó para la extracción de plásmido amplicón control.

Extracción y purificación con QIAGEN Large-Construct Kit

Se procedió a la extracción siguiendo el protocolo del kit *QIAGEN Large-Construct Kit*. Se sembró una placa de agar LB/cloranfenicol en una concentración de 12,5 µg/mL con *E. coli* portando el bácmido, y se incubó por 48 horas a 30°C. A partir de una única colonia aislada se inocularon tubos de pre-cultivo con 5 mL de LB/cloranfenicol y se incubaron a 37°C y 200 rpm de agitación durante 16 horas. Para el cultivo se inocularon 500 mL de LB/cloranfenicol con 0,5 mL de pre-cultivo (dilución 1/1000) y se incubó por 16 horas a 37°C y 180 rpm. Para la obtención de las células del cultivo se centrifugó a 6000 x g y 4°C durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. Esta y todas las rondas de centrifugación fueron realizadas en un equipo *Beckman J2-21*. A continuación, se resuspendió el sedimento en 20 mL de buffer P1 compuesto por Tris·HCl 50 mM pH 8.0, EDTA 10 mM al cual se le agregó una enzima RNA-asa proporcionada por el fabricante. Se mezcló con pipeta y por inversión hasta que el sedimento se disolvió completamente. A la suspensión se agregó 20 mL de buffer P2 (NaOH 200 mM y

SDS 1%) y se mezcló completamente mediante inversión del tubo unas cuatro o cinco veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos. Una vez transcurridos ese tiempo se le agregaron 20 mL de buffer P3 (acetato de potasio 3 M pH 5,5) previamente enfriado y se mezcló suavemente por inversión del tubo unas cinco veces y se incubó en hielo unos 10 minutos. Luego de agregado el buffer P3 se observó la formación de un material “plumoso” (ADN genómico y restos celulares) que fue retirado mediante centrifugación a 20000 x g por 30 minutos a 4°C y se recuperó el sobrenadante (conteniendo el báculo). El paso siguiente fue la clarificación del sobrenadante conteniendo el BAC mediante el filtrado a través de un filtro previamente humedecido con agua miliQ. La precipitación del ADN se lleva a cabo mediante el agregado al lisado clarificado de 0,6 volúmenes de isopropanol a temperatura ambiente. Se mezcló y se centrifugó inmediatamente a 15000 x g y 4°C durante 30 minutos. A continuación, se procedió al lavado del sedimento de ADN con 5mL de etanol a temperatura ambiente y se centrifugó a 15000 x g por 15 minutos, de esta forma el etanol remueve sales precipitadas y reemplaza al isopropanol, siendo este último menos volátil, y facilita la suspensión del ADN. Posteriormente se secó el sedimento invirtiendo el tubo en un papel absorbente y dejándolo secar al aire por 5 minutos. Se disolvió completamente el ADN en 9,5 mL de buffer EX y se adicionaron 200 µL de Exonucleasa ATP-dependiente (disuelta previamente en “Exonuclease Solvent” también proporcionado por el kit*), 300 uL de la solución de ATP preparada previamente*, se mezcló gentilmente y se incubó durante 60 minutos en un baño maría a 37°C. Lo siguiente fue equilibrar la columna (QIAGEN-tip 500) mediante la aplicación de 10 mL de buffer QBT (NaCl 750 mM, MOPS 50 mM, pH 7.0, isopropanol 15%, 0.15% Triton®, X-100), se permitió a la misma vaciarse por gravedad. Se le adicionaron 10 mL de buffer QS (composición no detallada) a la muestra de ADN y se aplicó toda la muestra a la columna, permitiendo que entre a la resina mediante gravedad. Luego se lavó la columna dos veces con 30 mL de buffer QC (NaCl 1.0 M, MOPS 50 mM pH 7.0, isopropanol 15%) y se eluyó el ADN con 15 mL de buffer QF (1.25 M NaCl, Tris-Cl 50 mM pH 8.5, 15% isopropanol) precalentado a 65°C. Para precipitar el ADN se agregaron 0,7 volúmenes (10,5 mL) de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló y se centrifugó inmediatamente a 15000 x g por 30 minutos a 4°C. Se decantó el sobrenadante cuidadosamente y se lavó el sedimento con 5 mL de etanol 70% a temperatura ambiente y se centrifugó a 15000 x g por 15 minutos. Se secó el sedimento obtenido (no visible) al aire

durante 5 minutos y se disolvió el ADN O.N. en 1 mL de buffer TE (Tris·Cl 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM), enjuagando las paredes del tubo para recuperar la mayor cantidad posible de BAC.

** Este kit hace uso de una enzima exonucleasa en un paso de digestión que se encarga de purificar el extracto de BAC de aquellas moléculas que puedan estar fragmentadas. Por eso fue necesario previamente preparar la solución de ATP (proporcionada por el kit) mediante la disolución de 2,75 g de ATP (sal disódica) en 40 mL de agua miliQ. Se ajustó el pH a 7,5 y se llevó el volumen final a 50 mL. La solución fue almacenada en alícuotas de 300 uL a - 20°C.*

Extracción y purificación con NucleoBond® Xtra Maxi - Macherey Nagel

El procedimiento para el cultivo y la extracción con este kit fue idéntico al detallado para la extracción del plásmido control pHSV-IRES-EGFP salvo dos modificaciones: el cultivo mayor, de 500 mL fue incubado durante 12 horas en lugar de las 16 horas que se incubó para la extracción del plásmido control. Además, se utilizaron medios con 12.5 µg/mL de cloranfenicol en lugar de ampicilina, ya que el bácido porta resistencia a este antibiótico. Al igual que para los plásmidos, las producciones de bácido fueron analizadas por electroforesis en gel de agarosa 1% y cuantificados por *NanoDrop™ Lite Spectrophotometer Thermo Scientific*.

4.3 - Electroforesis en gel de agarosa.

Se prepararon los geles de agarosa al 1% utilizando buffer Tris-Acetato-EDTA 1X (TAE) (40 mM Tris-base pH 7.6, 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA). La visualización de los ácidos nucleicos se realizó bajo luz ultravioleta y se utilizó el reactivo GoodView™ Nucleic Acid Stain (SBS Genetech). Las muestras se diluyeron a 1x con tampón de carga 6x (glicerol 50%, azul de bromofenol 0.02%, xilencianol 0.002%) Se realizó la corrida electroforética en TAE 1X, por 30 minutos. Todas las electroforesis se realizaron a 80 mV, utilizando Thermo Scientific™ GeneRuler 1 kb DNA Ladder como marcador de peso molecular.

4.4 - Transfección de las células Vero 2.2 con los componentes del sistema

El vector viral se produjo en células Vero 2.2 mediante una transfección múltiple, en presencia de Lipofectaminutosa LTX[®] y PLUS-Reagent *ThermoFisher Scientific*, con los tres componentes del sistema: uno de los tres plásmidos amplicón (pHSV1-IRES-EGFP, pHSV-OH1_{wt}-IRES-EGFP o pHSV-OH1_{C112S}-IRES-EGFP), el bácmido (fHSV-Δpac-ΔICP27) y el plásmido auxiliar conteniendo el gen de ICP27 de HSV-1 (pEBHICP27). Este protocolo se encontraba disponible en nuestro grupo y fue cedido por el Dr. Fraefel del Instituto de Virología de la Universidad de Zúrich (Suiza) y puesto en marcha durante la tesis de Maestría de D. Porley (26). Este protocolo de transfección fue realizado en placas de 100 mm diámetro (p100) y en frascos de cultivo de 175cm² (f175).

A continuación, se detalla el procedimiento para una placa p100, para los ensayos con f175 se aplicó el mismo protocolo ajustando los volúmenes en base a que la superficie del tapiz celular en una f175 es 2,2 veces la de una p100. Se dispuso de 2 tubos de 15 mL, un tubo “D” y uno “L” (un para la mezcla con el “DNA” y el otro para la solución de Lipofectamina, respectivamente) ambos con 690 μL de Optimem (*Gibco™ Opti-MEM™ I Reduced Serum Media*). En el tubo D se agregaron 5,5 μg de fHSV-Δpac-ΔICP27, 0,5 μg de plásmido auxiliar y 1,1 μg de amplicón. A continuación, se agregaron 27,6 μL de PLUS-Reagent al tubo D y sin mezclarlo se dejó reposar por 5 minutos. Luego se mezcló suavemente y se dejó reposar por otros 5 minutos más. En el tubo L se mezclaron suavemente 46,4 μL de Lipofectaminutosa LTX con el Optimem mediante inversión del tubo. Se vertió el contenido del tubo L en el tubo D y se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 minutos. Pasado este tiempo se adicionaron 2,5 mL de Optimem al tubo D+L y se mezcló por inversión. Se lavaron las células con 5 mL de Optimem y se le agregaron 3,6 mL de la suspensión del tubo D+L. Se incubaron por 4 horas a 37°C en una atmósfera del 5% CO₂, teniendo la precaución de mover la placa cada 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se removió la solución de transfección de las células y se las lavó con 5 mL de Optimem. Se le agregaron 9,6 mL de medio de transfección (DMEM sin antibióticos, con 2% de SFB) y se incubaron 37°C en una atmósfera del 5% CO₂ durante 72 horas. Durante ese período de incubación se observaron las células en busca de la aparición del efecto citopático característico de la expresión de genes de HSV-1.

Se realizaron seis ensayos de transfección diferentes:

- Las primeras tres producciones (1, 2 y 3) se realizaron en placas p100 para producir vectores control (HSV1-EGFP). Los plásmidos utilizados en estas transfecciones fueron producidos durante esta tesis. El plásmido amplicón control (pHSV-IRES-EGFP) se extrajo y purificó mediante maxiprep *MACHEREY-NAGEL kit*, el plásmido auxiliar (pHEBICP27) fue extraído y purificado mediante minipreps *Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit*. El bácmido usado en estas producciones provino de una mezcla de generada a partir de las purificaciones realizadas por D. Porley (26) y M. Margenat (28).
- En las otras 3 producciones (4, 5 y 6) se utilizaron como soporte botellas f175 y se produjeron los tres tipos de vectores virales: control (HSV1-EGFP), portando el gen de OH1 salvaje (HSV1-OH1_{wt}-EGFP) y OH1 mutante (HSV1-OH1_{C112S}-EGFP). Los plásmidos utilizados en estas transfecciones fueron producidos durante esta tesis. El plásmido auxiliar pHEBICP27 así como los dos plásmidos amplicones que portan la fosfatasa viral salvaje o el mutante inactivo (pHSV1-OH1_{wt}-IRES-EGFP y pHSV1-OH1_{C112S}-IRES-EGFP respectivamente) fueron purificados utilizando maxiprep *MACHEREY-NAGEL kit*. El plásmido amplicón control pHSV-IRES-EGFP fue el mismo que en las transfecciones anteriores. El bácmido fHSV- Δ pac- Δ ICP27 fue extraído y purificado mediante kit *NucleoBond® Xtra Maxi - Macherey Nagel*.

4.5 - Cosecha de vectores

Al tercer día de realizada la transfección se cosecharon las partículas de vector viral de HSV-1. La cosecha se realizó aún con el medio de cultivo presente en la placa/botella, desprendiendo las células del soporte mediante el uso de un raspador de forma cuidadosa y exhaustiva, recolectando las células en el mismo medio de cultivo. Para separar las células del medio que contiene la fracción extracelular de partículas virales liberadas por células muertas, se realizó un centrifugado a 1400 x g durante 10 minutos a 10°C. De esta forma se separan las células y los restos más grandes (sedimento) y por otro lado los vectores y componentes del medio de cultivo (sobrenadante). Una vez separadas ambas fracciones se almacenaron a -80°C. El sedimento celular fue suspendido en 250 µL de DMEM al 10% de SFB y sometido a tres ciclos de congelamiento en N₂ líquido y descongelamiento en baño María a 37°C, a fin de lisar las células y liberar las partículas virales en su interior. Estas partículas fueron recuperadas del sobrenadante luego de una centrifugación a 4000 x g durante 10 minutos a 4°C, para separarlas de los restos celulares. El sobrenadante resultante se almacenó a -80°C. De esta forma se obtuvieron 2 fracciones por cosecha; las partículas de HSV-1 amplicón extracelulares, y la fracción de partículas de HSV-1 intracelulares.

4.6 - Concentración de los vectores HSV-1 tipo amplicón.

Se evaluaron estrategias para concentrar las partículas virales obtenidas después de la cosecha, alternativas a la centrifugación en colchón de sacarosa (implementada por el equipo de trabajo hasta ese momento). Se utilizaron técnicas basadas en ultrafiltración a través de membranas de celulosa semipermeables, presentes en centricones *Centriprep Millipore* (Figura 6) con un corte de poro de 50 KDa (29), y también concentraciones mediante centrifugación con vacío en equipo Savant SpeedVac.

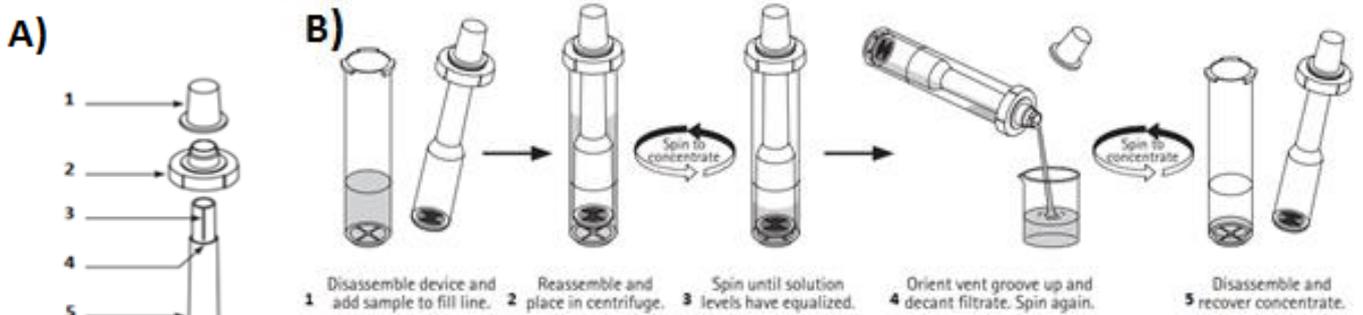


Figura 6. A) Esquema de centrificación *Centriprep* empleado en la concentración de los vectores virales pHSV-IRES-EGFP producidos en las producciones 1,2 y 3. 1) Tapa del tubo colector. 2) Tapa a rosca, ajusta el tubo colector al contenedor de la muestra. 3) Ventilación, permite salida del aire para permitir filtración de la muestra. 4) Reborde del tubo colector. 5) Tubo colector. 6) Membrana semipermeable de 50 KDa. 7) Contenedor de la muestra. 8) Volumen máximo. **B) Modo de uso del dispositivo *Centriprep*.** 1) La muestra se coloca en el recipiente. 2) Se ubica el tubo colector que contiene la membrana semipermeable y este desplaza la muestra. 3) Al centrifugar el dispositivo se genera fuerza sobre el tubo colector la cual genera una presión diferencial de la muestra sobre la membrana, forzando a los solventes y los materiales con menor peso molecular a pasar hacia el tubo colector. El proceso de filtración se dará hasta que se alineen los meniscos de la muestra y el Flow-through, es decir, se igualen las presiones. 4) Luego se descarta el “Flow-through” del tubo colector retirando la tapa superior. 5) Se desensambla el centrícón y se colecta el concentrado. Adaptado de referencia 29.

Concentración por ultrafiltración.

Se concentraron por ultrafiltración mediante centrifugación en centrícón la cosecha obtenida de las producciones 1, 2 y 3 mediante centrifugado del dispositivo conteniendo la muestra a 1500 x g y 16°C en una centrifuga *Sigma 2-16KL rotor 12071*.

Para estas muestras se concentró solo la fracción extracelular de las producciones (sobrenadante de la transfección). Se realizaron tandas de centrifugación (agregando alícuotas de la muestra en cada una) tal como se describe en la Figura 6, llevando el volumen contenido en el centrícón a aproximadamente 1,5 mL. Tanto el dispositivo como las muestras fueron manipulados en condiciones de esterilidad.

Concentración por centrifugación a vacío en SpeedVac.

Para la concentración mediante centrifugación a vacío, se trabajó en un equipo Thermo Scientific *Savant SPD 2010 SpeedVac Concentrator*. La cosecha total (fracción intra- y extracelular) de los ensayos 4, 5 y 6 fueron concentradas mediante SpeedVac. Se fraccionaron cada una de las muestras en 8 tubos de centrifuga de 15 mL. Cada tubo conteniendo 2.9 mL de muestra. En ambos casos se trabajó a temperatura ambiente y 5,1 vac (máximo vacío al que trabaja el equipo). Se controló el volumen cada 30 minutos para evitar un desecamiento total de las muestras.

4.7 - Titulación de los vectores HSV-1 tipo amplicón.

Los ensayos de titulación para las producciones de HSV-1 tipo amplicón se realizaron mediante el conteo de focos fluorescentes producto de la transducción exitosa del gen EGFP dentro de la célula. Dicho conteo se realizó empleando un microscopio de epifluorescencia *NIKON Microphot - FXA*.

El título de las producciones 1, 2 y 3 se realizó tanto en células HeLa como en Vero, y se titularon las fracciones extracelular (sobrenadante del cultivo celular) e intracelular (recuperado a partir del sedimento celular).

Los ensayos de titulación de las producciones 4, 5 y 6 se realizaron solo en células Vero. Para estas muestras se combinaron las fracciones extra e intracelular antes del paso de concentración. Todas las titulaciones fueron realizadas en placas de 4 pocillos por duplicado y se incluyó un control de células sin infectar por línea celular utilizada en cada ensayo. Se sembraron aproximadamente 1×10^5 células por pocillo. Las células fueron preparadas 24 horas antes y se lavó la monocapa con medio DMEM sin suero y se dejaron adsorber con el inóculo viral durante 1 hora. Luego se le adicionaron 500 μ L de medio DMEM con 2% de SFB, sin antibióticos. Todas las inoculaciones se realizaron por duplicado en placas de 4 pocillos. En la tabla 1 se detallan los volúmenes de cada producción inoculados.

Tabla 1. Tabla de titulaciones realizadas. .

PRODUCCIÓN	Fracción titulada	Volumen de Pre concentrado	Volumen de Post concentrado inoculado
		inoculado por pocillo (μL)	por pocillo (μL)
1	Sobrenadante	1 por línea celular 10 por línea celular	1 por línea celular 10 por línea celular
	Sedimento	10	-
2	Sobrenadante	10 por línea celular	10 por línea celular
	Sedimento	10	-
3	Sobrenadante	10 por línea celular	10 por línea celular
	Sedimento	10	-
4	Sobrenadante		10
	+ Sedimento	15	15
5	Sobrenadante		
	+ Sedimento	15	10
6	Sobrenadante		
	+ Sedimento	15	10

4.8 - Ensayo de viabilidad en células transducidas con los vectores HSV-1 tipo amplicón.

El marcado con Ioduro de Propidio (IP) es usado comúnmente como ensayo de viabilidad celular ya que entra y se une al ADN de células que tiene la membrana celular comprometida (células muertas). El IP es un agente intercalante que se une al ADN de doble hebra sin preferencia por ninguna secuencia, intercalándose una molécula cada 4–5 pares de bases, de forma similar al Bromuro de Etidio. Esta molécula cuando es excitada a 535 nm tiene un pico máximo de emisión en el color rojo a 617 nm. El marcado con IP es utilizado también como contraste en técnicas de fluorescencia multicolor, pues marca sólo las células dañadas, a diferencia de otras señales fluorescentes que ingresan tanto en células muertas como vivas (30).

En la presente tesis, se realizó el experimento en las líneas celulares Vero y HeLa, utilizando IP, uno a concentración de 10 $\mu\text{g} / \text{mL}$ (suministrado por A. Ferreira del Laboratorio de Inmunología, FCIEN/FQ). Se prepararon placas de 4 pocillos con 8×10^4 células por pocillo, una placa por cada variante del vector: HSV1-EGFP, HSV1-OH1_{wt}/EGFP y HSV1-OH1_{C112S}/EGFP. Se incubaron las placas durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂ en medio DMEM con 10% de SFB y antibióticos. Se retiró el medio y se inocularon en cada placa 2 pocillos (quedando como control un pocillo sin inocular) con 300 μL de una de las tres cosechas de vectores virales previamente concentrados como se indicó anteriormente. A los tres pocillos luego del agregado del respectivo vector se le agregó 300 μL de medio DMEM al 4% de SFB con antibióticos (quedando el volumen total a un 2% de SFB) y se incubó durante 24 horas a 37°C y 5% de CO₂. Se adicionó un volumen de 0,6 μL de cada uno de los IP a los pocillos de modo que a cada uno de los dos pocillos de cada placa se le agregó un IP distinto. Se incubaron durante 15 minutos a temperatura ambiente y se observaron en microscopio de fluorescencia BIORAD – ZOE Fluorescent Cell Imager.

5 - RESULTADOS

5.1 - Calidad y concentración de los componentes del sistema.

Se realizó con éxito la extracción y purificación de los distintos elementos genéticos (plásmidos y báculo) necesarios para la producción de los vectores HSV-1 tipo amplicón. A continuación, se presentan los resultados de los análisis de calidad de cada uno de ellos.

Plásmido control pHSV-IRES-EGFP y plásmido auxiliar pEBHICP27 purificado con NucleoBond® Xtra Maxi - Macherey Nagel.

Se obtuvieron en buena cantidad y pureza los dos plásmidos (pEBHICP27 y pHSV-IRES-EGFP). En la Figura 7 A (carril 3 y 5), se puede observar una banda principal correspondiente a dichos plásmidos y la ausencia de fragmentación de estos. Sumado a esto, los datos de A_{260}/A_{280} proporcionados por nanodrop evidencian un grado óptimo de pureza ($A_{260}/A_{280} > 1,8$), siendo 1,86 para pHSV-IRES-EGFP y 1,89 para pEBHICP27. Se obtuvo una alta concentración para ambas extracciones como es de esperar para una maxiprep: 700 μL a 749,0 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para la extracción de pHSV-IRES-EGFP y 500 μL a 839,0 $\text{ng}/\mu\text{L}$ para pEBHICP27 (Tabla 2).

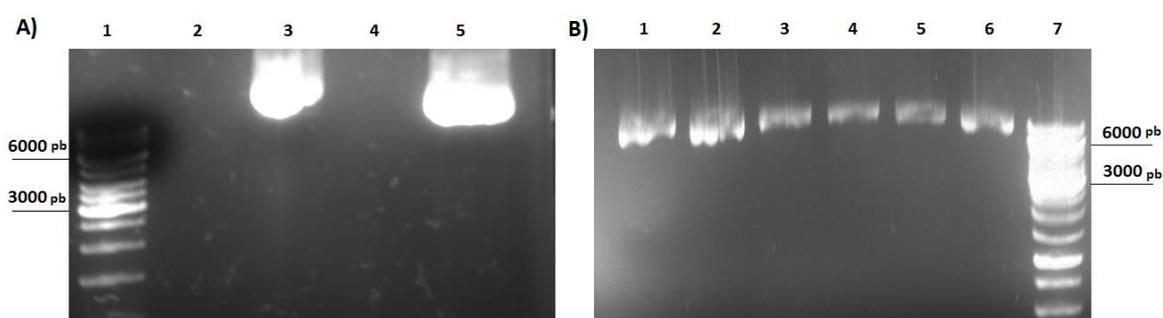


Figura 7. Electroforesis de plásmidos en gel de agarosa 1%. A) pHSV-IRES-EGFP y pEBHICP27 obtenidos con *NucleoBond® Xtra Maxi - Macherey Nagel*. Carril 1: Marcador de pares de bases. Carril 3: pHSV-IRES-EGFP. Carril 5: pEBHICP27. B) pHSV-IRES-EGFP-OH1_{wt} y pHSV-IRES-EGFP-OH1_{C112S} obtenidos con *Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit*. Carril 2, 4 y 6: pHSV-IRES-EGFP-OH1_{wt}, Carril 1, 3 y 5: pHSV-IRES-EGFP-OH1_{C112S}, carril 7: Marcador de pares de bases.

Plásmidos pHSV-IRES-EGFP-OH1_{wt} y pHSV-IRES-EGFP-OH1_{C112S} purificado con el kit Thermo Scientific GeneJET Plasmid Miniprep Kit.

Para los plásmidos amplicones portando las dos variantes de la fosfatasa viral (salvaje e inactiva) se realizaron tres mini-cultivos para extraer con este kit. En la Figura 7 B, se observa la integridad de los plásmidos, los que además cuentan con una alta pureza, así como concentraciones razonables para una miniprep, las cuales se incluyen en la Tabla 2.

Tabla 2. Extracciones de plásmidos pHSV-IRES-EGFP-OH1_{wt}, pHSV-IRES-EGFP-OH1_{C112S}, pHSV-IRES-EGFP y pEBHICP27
(plásmidos amplicones portando las dos variantes de la fosfatasa viral, salvaje e inactiva).

Purificación del Plásmido	Volumen (μL)	Concentración (ng/μL)	Pureza (A ₂₆₀ /A ₂₈₀)
pHSV-IRES-EGFP-OH1_{wt}			
1	50	90,0	1,82
2	50	126,8	1,90
3	50	145,3	1,89
pHSV-IRES-EGFP-OH1_{C112S}			
1	50	90,0	1,88
2	50	115,3	1,88
3	50	112,5	1,86
pHSV-IRES-EGFP			
1	50	749	1,89
pEBHICP27			
1	50	839	1,86

Bácmido fHSV-Δpac-ΔICP27 purificado con QIAGEN Large-Construct Kit y con NucleoBond® Xtra Maxi - Macherey Nagel.

La extracción de bácmido realizada con este kit no fue del todo exitosa ya que, si bien se obtuvo una pureza relativa muy buena, de 1,94, corroborada mediante análisis electroforético en gel de agarosa (Figura 8 A); la concentración de la extracción fue de solo 48,0 ng/μL (volumen de 1 mL). Esto motivó una segunda extracción que se describe a continuación, pero usando el kit Macherey Nagel (Figura 8 B), previamente empleado en las extracciones de plásmido amplicón control (pHSV-IRES-EGFP) y plásmido auxiliar (pEBHICP27). Utilizando este procedimiento se logró a primera vista un mejor rendimiento y

buena calidad del plásmido obtenido, siendo la pureza muy buena (1,97) y la concentración de 840,0 ng/ μ L (volumen de 750 μ L). De hecho, se obtuvo unas 13 veces más cantidad de b́acmido utilizando este kit (739.5 μ g).

Evaluación de lotes de b́acmido generados previamente por el grupo.

Se analizaron por nanodrop y electroforesis (Figura 8 C) 3 lotes generados previamente por el equipo de trabajo (25) (28). En la Tabla 3 se detallan la pureza, concentración y volumen de estos, que reflejan el mantenimiento de la calidad del material previamente generado, adecuado para los ensayos de transfección.

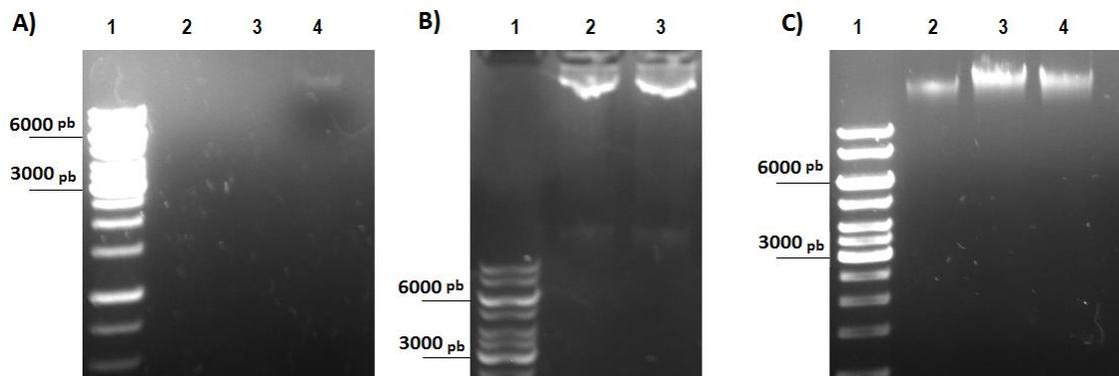


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 1% de las muestras correspondientes a las purificaciones del b́acmido.

A) fHSV- Δ pac- Δ ICP27 obtenido con QIAGEN Large-Construct Kit. Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 4: fHSV- Δ pac- Δ ICP27. **B) fHSV- Δ pac- Δ ICP27 obtenido con NucleoBond[®] Xtra Maxi - Macherey Nagel.** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2 y 3: extracción de fHSV- Δ pac- Δ ICP27. **C) Lotes de fHSV- Δ pac- Δ ICP27.** Carril 1: Marcador de peso molecular. Carril 2: lote1. Carril 3: lote 2. Carril 4: lote 3

Tabla 3. Volumen, concentración y pureza relativa* de los pools de extracciones de fHSV-Δpac-ΔICP27.

Bácmido	Volúmen (μL)	Concentración (ng/μL)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀ *
<i>QIAGEN extracción</i>	1000	48	1,94
<i>NucleoBond extracción</i>	750	840	1,97
Pool 1	480	74,7	1,83
Pool 2	90	137,5	1,87
Pool 3	70	61,7	1,79

5.2 - Producción y titulación de vectores

Como se describió en la metodología, se realizaron un total de seis ensayos de producción de vectores HSV-1 tipo amplicón, mediante transfección múltiple en células de la línea Vero 2.2. Luego de realizada las cosechas de ambas fracciones (fracción extracelular en el sobrenadante de la cosecha, e intracelular en el sedimento y monocapa) de los vectores HSV-1 tipo amplicón se titularon mediante el conteo de focos fluorescentes en microscopio de epifluorescencia (Figura 9). Se considera cada foco o célula fluorescente (debido a la expresión de la EGFP) como el producto de una única unidad transductante.

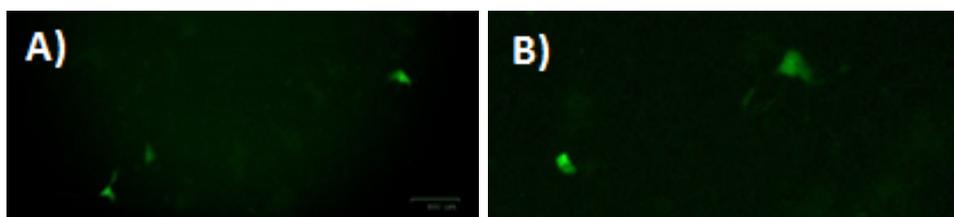


Figura 9. Focos fluorescentes producto de la expresión de EGFP en células eucariotas transducidas con el vector HSV-EGFP-OH1_{wt}. **A)** En la imagen se pueden observar 3 células Vero con fluorescencia típica de la presencia de EGFP y que se asume son producto de 3 eventos de transducción independientes. **B)** En la imagen se puede observar 2 células HeLa con fluorescencia típica de la presencia de EGFP y que se asume son producto de 2 eventos de transducción independientes. Las imágenes son representativas de lo observado en las placas de titulación, analizadas en Microscopio de Epifluorescencia.

En la Tabla 4 se detallan los títulos de las producciones tituladas (1 y 2) tanto en Vero como en HeLa. Como se puede observar la línea celular Vero fue más efectiva en la determinación del título de los vectores.

Tabla 4. Titulación de las producciones previo al proceso de concentración.

PRODUCCIÓN	Vector amplicón generado	Cosecha (mL)	*Título en Vero (UT/mL)	*Título en HeLa (UT/mL)
1	Sobrenadante	18,5	1800	1600
	Sedimento	0,25	40000	-
2	Sobrenadante	37	2600	900
	Sedimento	0,25	76000	-

En la producción 3, la ausencia de focos fluorescentes impidió definir un título con nuestro protocolo que empleaba un volumen máximo de inóculo de 10 μ L, por lo que se estima que el título está por debajo de 100 UT/mL. El bajo título puede deberse a que esta producción de vectores fue realizada empleando una cantidad de báculo menor a lo requerido en el protocolo. Además, en esta producción la confluencia del tapiz celular fue la más baja, siendo apenas del 60%. Luego de la titulación del sobrenadante de la producción 3 se dejó de emplear HeLa en las titulaciones, debido a que es una línea celular más heterogénea donde se observaron más células desprendidas lo que no permitía realizar un conteo de focos preciso. Así, se decidió titular las siguientes producciones de los vectores HSV-1 tipo amplicón solo en la línea celular Vero.

Durante las producciones 4, 5 y 6 se observó un marcado efecto citopático, concentrado en la porción superior del tapiz celular de la botella f175, lo que puede sugerir que durante la incubación de la transfección la monocapa celular no fue cubierta por el inóculo de forma homogénea.

5.3 - Concentración de las producciones de vectores generadas.

Las producciones 1, 2 y 3 fueron concentradas mediante ultrafiltración por centrifugación en centrífuga; las producciones 4,5 y 6 mediante centrifugación en vacío en SpeedVac. En la Tabla 5 se expresan los resultados de las concentraciones realizadas por ambos métodos. Además, se indican los tiempos requeridos, los volúmenes y el porcentaje total de partículas pérdidas durante el procedimiento.

En una primera etapa, para la concentración de la producción 1 se realizaron 2 tandas de ultrafiltración con un volumen de 9 mL cada una. Se agregaron los primeros 9 mL al centrífuga y se centrifugó por 40 minutos, hasta que el volumen fue de aproximadamente 1 mL. A continuación, se le agregaron los otros 9 mL y se centrifugó por 45 minutos más, alcanzándose un volumen final de aproximadamente 1,6 mL. En el caso de la concentración de la producción 2 se requirió de tres rondas de centrifugación de 6 mL y un agregado final de 7 mL, en aproximadamente 190 minutos. Luego de concentrar los primeros 18 mL a un volumen de 1 mL, los siguientes 7 mL agregados no se pudieron concentrar. Sospechamos que esto se debió a un taponamiento de la membrana del dispositivo que derivó en una dilución del volumen hasta ese momento concentrado que pasó de 1 mL a 7 mL y solo fueron procesados 25 mL de los 37 mL totales. Posteriormente se decidió concentrar la producción 3 (cuyo título se estima por debajo de 100 UT/mL). Esta muestra se procesó en 3 tandas de 6 mL, en 85 minutos totales, obteniéndose un volumen final de 1,5 mL.

En una segunda etapa, como puesta a punto del procedimiento de centrifugación a vacío, se realizó la concentración de los vectores HSV-1 tipo amplicón del sobrenadante de la producción 2. Luego de este procedimiento se pasó de un título inicial de 1950 UT/mL en 7 mL, a 18200 UT/mL en los 0,7 mL obtenidos al final del proceso, lo que significaría una pérdida de partículas virales de apenas el 6,7 % y una concentración de la muestra de casi 10x. Dicho proceso duró 235 minutos. Luego de la puesta a punto se procedió a la concentración de las producciones de vectores 4, 5 y 6 (Tabla 5).

Finalmente, una vez concentrados los sobrenadantes de las 6 producciones se realizó la titulación de estas. Cabe señalar que durante las titulaciones de estas producciones

concentradas se observó un efecto citotóxico sobre la monocapa celular, observándose desprendimiento de parte (máximo 25% en la producción 4) del tapiz de células. Por lo cual se realizó el conteo de los focos en las porciones de tapiz que todavía permanecían unidas a la placa, prorrateando el resultado a la superficie total de la placa. Para las otras dos muestras utilizadas (producciones 5 y 6) el efecto fue mucho menos marcado el desprendimiento de células del tapiz, apreciándose apenas pequeños sectores en los pocillos. Los resultados mostrados en la Tabla 5 indican que al concentrar por vacío se logra un factor de concentración mayor, tanto de título como volumen y en general una menor % de pérdida de partículas de vector viral.

Tabla 5. Concentración de las producciones de vectores HSV-1 tipo amplicón. Se consideran solo los títulos obtenidos en la línea celular Vero.

Producción	Vector amplicón	Título Pre concentración (UT/mL)	Título Post concentración (UT/mL)	Factor de concentración (TÍTULO)	Método de concentración	Volumen pre concentración (mL)	Volumen post concentración (mL)	Factor de concentración (VOLUMEN)	% de pérdida de partículas	Tiempo (minutos)
1	Sobrenadante	1800	13300	7,4	Centricón	18,5	1,6	11,6	36,1	85
	Sedimento	40000	-	-	-	-	-	-	-	-
2	Sobrenadante	2600	4300	1,7	Centricón	25	7	3,6	53,7	145
	Sedimento	76000	-	-	-	-	-	-	-	-
3	Sobrenadante	<100	-	-	Centricón	18	1,5	12	-	75
	Sedimento	<100	-	-	-	-	-	-	-	-
	Prueba/puesta a punto	1950	18200	9,3	SpeedVac	7	0,7	10	6,7	235
4	Sobrenadante + Sedimento	900	16300	18,1	SpeedVac	23	0,8	28,8	37	300
5	Sobrenadante + Sedimento	133	1300	9,8	SpeedVac	23	0,6	38,3	74,5	380
6	Sobrenadante + Sedimento	266	9000	33,83	SpeedVac	23	0,6	38,33	11,8	380

5.4 - Viabilidad en células transducidas con los vectores HSV-1 tipo amplicón previamente concentrados.

Estos ensayos se realizaron en las células Vero y HeLa transducidas con los vectores concentrados únicamente por SpeedVac. Se decidió inocular con un mismo volumen de concentrado viral (300 μ l por pocillo de placa p4 conteniendo 8×10^4 células), de manera de equiparar el posible efecto citotóxico de la muestra concentrada. Se evidenció un claro efecto citotóxico del material concentrado, siendo menor el efecto en el caso del concentrado que contenía menor cantidad de partículas virales, correspondiente al ensayo con el vector HSV1-EGFP-OH1_{WT}. De hecho, el resultado de viabilidad utilizando IP se pudo analizar únicamente en las placas en las que se utilizó una MOI de 0.005 del vector concentrado HSV1-EGFP-OH1_{WT}. Las otras placas correspondientes a los ensayos con los vectores control HSV1-EGFP y el HSV1-EGFP-OH1_{C112S} no se analizaron ya que presentaron un porcentaje de muerte muy elevado, observándose muy pocas células remanentes adheridas a la placa. De hecho, en estos ensayos la MOI fue de 10 a 100 veces mayor que en el ensayo que sí pudo ser analizado. La Figura 10 muestra las imágenes de las células observadas en un microscopio de epifluorescencia para evidenciar la viabilidad celular luego de incubar con el IP (células muertas), observándose una mortalidad del 2 % para Vero y del 5% para HeLa.

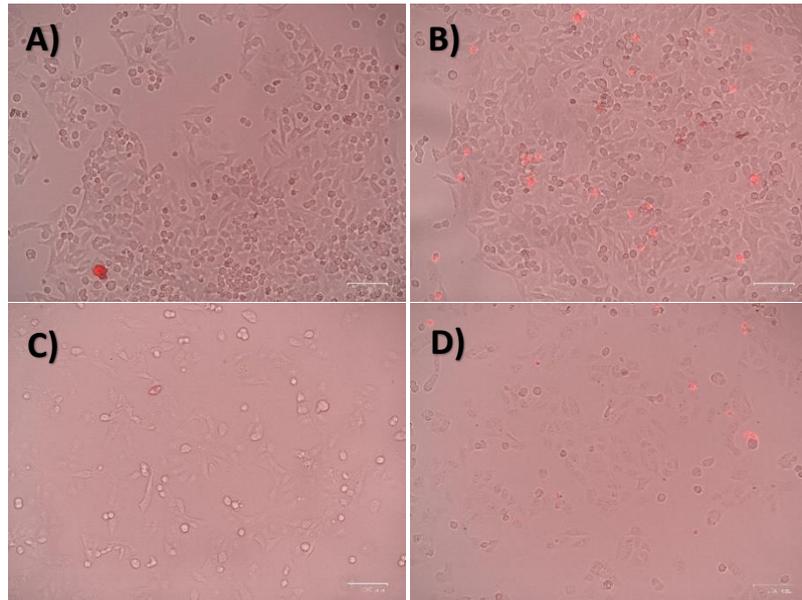


Figura 10. Ensayo de evaluación de la viabilidad celular en células Vero y HeLa. Las células fueron incubadas con 0,6 μ L de los IP durante 15 minutos y se capturaron imágenes en microscopio de campo claro y con filtro rojo para evidenciar células muertas fluorescentes en rojo. Se muestra el resultado de ambas imágenes combinadas. **A)** HeLa, control sin IP. **B)** HeLa incubadas con IP. **C)** Vero, sin IP. **D)** Vero incubadas con IP.

6 - DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

A lo largo de este trabajo de grado se logró producir y cuantificar vectores HSV-1 tipo amplicón. Se buscó aplicar y evaluar alternativas a la ultracentrifugación en colchón de sacarosa para la concentración de estas producciones de partículas virales. Por último, se buscó evaluar la viabilidad celular en Vero y HeLa transducidas con vectores HSV-1 tipo amplicón que permitían la expresión de la fosfatasa OH1 de virus Orf en dichas células.

6.1 - Evaluación de la producción de los vectores HSV-1 tipo amplicón.

El bajo rendimiento obtenido con kit *QIAGEN Large-Construct* puede deberse a la pérdida del bÁcmido durante su purificación. Si analizamos el protocolo, podemos señalar que durante el proceso de extracción, luego de la etapa de precipitación, se dejó el tubo a 4°C durante 8 horas después del centrifugado con isopropanol, para continuar con el procedimiento el día siguiente. Es posible que el estado de alguno de los reactivos pudo estar involucrado en una pobre extracción de material genético. Esto se ve apoyado por antecedentes del grupo con este kit, en los cuales se obtuvo en una de las preparaciones una concentración muy baja de bÁcmido de 10 ng/ μ L. También es posible que se haya dado una ruptura de varias de las moléculas de bÁcmido y estas hayan sido eliminadas por digestión durante el tratamiento con exonucleasa incluido en dicho kit. Este kit *QIAGEN* es ampliamente recomendado para extraer moléculas de alto peso molecular, como son los bÁcmidos, ya que el tratamiento con exonucleasa permite eliminar aquellas moléculas fragmentadas que pueden existir en el preparado.

Éste bajo rendimiento motivó una extracción de bÁcmido con el kit *NucleoBond® Xtra Maxi - Macherey Nagel*. Cabe destacar que este kit no incluye la etapa de tratamiento con exonucleasa. El bÁcmido obtenido presentó una buena concentración (unas 13 veces más que con el kit *QIAGEN*) y pureza tal como se describió en los resultados. A pesar de este buen resultado, esta producción de bÁcmido, utilizada en la generación de los vectores de las transfecciones 4, 5 y 6, dio lugar a un muy bajo título de vectores. De hecho, se registró títulos hasta casi 100 veces menores que el observado en las producciones 1, 2, y 3. Si bien no se pueden descartar otros factores que expliquen estos resultados, todo apunta a que el problema es la calidad del bÁcmido, ya que fue la única diferencia entre las producciones 1 a

3 respecto a las producciones 4 a 6, por lo que suponemos que la diferencia entre los títulos de estos dos grupos de producciones está relacionada directamente a la calidad de dicho componente del sistema. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la calidad del bácmido obtenido con el kit *NucleoBond*[®] no fue la apropiada para los ensayos de transfección con lipofectamina. De hecho, en las células transfectadas con dicha preparación se observó un acentuado efecto citopático y no se acompañó de una alta producción de partículas virales. Si bien esta producción presentó un buen índice de pureza (Abs_{260nm}/Abs_{280nm}) este refiere a ácidos nucleicos respecto a proteínas, pero no nos habla si existen fragmentos de ADN pequeños (no visibles en el gel de agarosa). Por lo tanto, tampoco sería contradictorio considerar que material genético fragmentado estaría presente en esta purificación de bácmido, que resulten tóxicos y/o afecten la eficiencia de producción de los vectores. Esto deja en evidencia la relevancia del paso de digestión con exonucleasa, de los fragmentos presentes en la extracción, paso incluido únicamente en el kit *QIAGEN*, kit que sería la mejor opción para obtener el bácmido purificado de alta calidad. Además, la entrada en las células de fragmentos del bácmido, no descartaría la expresión de proteínas virales que, si bien no es suficiente para la formación de partículas virales, puede llevar a la aparición de alteraciones en las células que pueden emular al efecto citopático que es característico durante la infección de HSV-1, lo que podría explicar el bajo título obtenido a pesar del acentuado efecto citopático observado en el momento de la cosecha. Concluimos así que sería conveniente adquirir nuevamente el kit *QIAGEN*, esperando obtener los resultados que previamente obtenía el grupo al utilizarlo en la producción del bácmido.

Por otro lado, hay otro aspecto a considerar que puede estar afectando la producción de los vectores virales, que es la calidad de los plásmidos HSV. De hecho, en la tesis de grado de Gabriela Morandi, quién también purificó los plásmidos HSV, surgió la discusión en torno a la conformación observada de los plásmidos purificados, que al igual que en esta tesis presentaron únicamente una conformación circular, no observándose la conformación superenrollada que esperamos fuera la más representada. Que todo el plásmido se encuentre en la conformación circular, puede estar indicando que el ADN doble hebra presenta un corte en una de las dos hebras, lo que hace que este se relaje completamente y migre como circular (con un peso mayor a sus pb). Cómo esto puede afectar la producción de los vectores virales debería ser evaluado en un futuro.

6.2 - Evaluación de las diferentes estrategias de concentración.

Nuestro equipo tenía la experiencia previa de la concentración por colchón de sacarosa, donde se habían logrado concentrar unas 40 veces (en volumen), pero perdiendo aproximadamente el 50% de las partículas virales totales (25). En la presente tesis, el porcentaje de pérdida de partículas durante la concentración por ultrafiltración fue de 37% (producción 1, en la cual se pudo procesar todo el volumen de muestra). A pesar de que el porcentaje de pérdida de partículas de vector fue similar al concentrar por ultrafiltración o concentrar con colchón de sacarosa (25), el costo del procedimiento por ultrafiltración es mayor considerando los precios de los insumos necesarios para llevar a cabo cada estrategia. Sería relevante realizar un mayor número de ensayos para afinar el % de pérdida de vector y/o los sistemas de ultrafiltración alternativos que se describen más adelante.

Por otro lado, la concentración por SpeedVac resulta una estrategia interesante, ya que permite procesar volúmenes más grandes de muestra que los centricones. Como se menciona en la introducción, a diferencia de virus desnudos como Rotavirus (27); no se encontraron en la literatura antecedentes de concentración de partículas virales envueltas mediante centrifugación a vacío. En la presente tesis se observó que este sistema de concentración aplicado a los vectores HSV tipo amplicón dio lugar en algunos de los casos a un bajo porcentaje de pérdida de partículas (6,7%). Sin embargo, las concentraciones posteriores no mantuvieron ese buen rendimiento, variando entre 11%-70% (Tabla 5). Además, el tiempo requerido para concentrar mediante SpeedVac es mucho mayor y variable que el de otras técnicas como ultracentrifugación en colchón de sacarosa o ultrafiltración a través de membranas semipermeables. A pesar de esto, considerando el promedio de los factores de concentración, al concentrar con SpeedVac se logró concentrar el título de los vectores unas 3-4 veces más que al utilizar ultrafiltración (Tabla 5).

Otro punto en el que la concentración por ultrafiltración mostró un mejor desempeño que el SpeedVac es que al utilizar una membrana de corte de 50 *kDa* los pequeños solutos del medio no se concentran. Sin embargo, al utilizar el SpeedVac se extrae principalmente el H₂O, por lo que se concentran los solutos, generando una muestra que aumenta la presión osmótica que se ejerce sobre las células tratadas con el vector concentrado de esta manera. Esto

claramente resultó tóxico, tal como se vio reflejado en la bajísima viabilidad celular observada en los ensayos. A pesar de esto, es importante destacar que la utilización de dicho equipo demostró que las partículas HSV-1 pueden someterse a procesos de concentración mediante centrifugación a vacío y permanecer viables, algo para lo que no se encontró evidencia bibliográfica.

A pesar de haber podido evaluar estas alternativas de concentración hubiera sido deseable poder realizar un mayor número de réplicas de los experimentos. Así mismo, nos quedó pendiente la prueba con *cassette* de ultrafiltración, que opera mediante el flujo tangencial de la muestra a concentrar, lo que evita obstrucciones y tiene un mejor desempeño. También se podrían emplear membranas semipermeables con un corte molecular diferente que permita una mejor concentración de las producciones con una pérdida mucho menor.

Otra alternativa a ensayar serían los cartuchos de fibra hueca con membranas formadas por poliéter sulfonas, similares a los *cassettes* de ultrafiltración para filtrar mediante flujo tangencial y que permiten la construcción de un sistema cerrado que puede ser sanitizado químicamente, algunas variantes incluso pueden ser autoclavadas. Esto es importante porque de esta manera se puede mantener la esterilidad durante todo el proceso.

Estos dispositivos además permiten procesar volúmenes mucho mayores que los centricones.

En conclusión, los resultados hasta ahora obtenidos sugieren que la ultrafiltración sería una opción a seguir evaluando, utilizando variaciones de dicho sistema como estrategia para la concentración de los vectores de HSV-1 tipo amplicón.

6.3 - Evaluación de la viabilidad celular

Este objetivo no se logró abordar en profundidad, aunque con las herramientas utilizadas se pudo observar el efecto tóxico de los vectores concentrados por SpeedVac sobre la monocapa celular. Pese a ser necesarios más ensayos, fue posible comparar los títulos de las producciones 4, 5 y 6 realizados en las células Vero. En este caso, el título fue entre 4-7 veces menor cuando se utilizó el vector portando el gen salvaje de OH1, respecto al vector control HSV1-EGFP, lo que puede estar sugiriendo que la expresión de OH1 afecta las a las células. Sería necesario realizar más experimentos donde se evalúe la viabilidad celular comparando el efecto de los vectores concentrados por ultrafiltración portando el gen de la OH1 salvaje o el mutante inactivo.

BIBLIOGRAFÍA

1. K.Y Green, B.N Fields, D.M Knipe, P.M Howley (2007) **Fields Virology. 5ta edición, Volumen 2, Capítulo 60 Herpes simplex viruses**; B. Roizman, D.M. Knipe, R.J. Whitley. Philadelphia, Lippincott-Williams & Wilkins Publishers.
2. C. M. Menendez, D.J.J. Carr (2017) **Defining Nervous System Susceptibility During Acute and Latent Herpes Simplex Virus-1 Infection.** *Journal of Neuroimmunology*; Vol. 308, 43-49; doi: 10.1016/j.jneuroim.2017.02.020.
3. J. Flint, V.R. Racaniello, G.F. Rall, A.M Skalka, L.W. Enquist (2015) **Principles of Virology. 4ta edición.** *American Society for Microbiology.*
4. K. L. Mossman, R. Sherburne, C. Lavery, J. Duncan, J. R. Smiley (2000) **Evidence that Herpes Simple Virus VP16 Is Required for Viral Egress Downstream of the Initial Envelopment Event.** *Journal of Virology*; Vol. 74; 6287-6299; doi: 10.1128/jvi.74.14.6287-6299.2000.
5. Newcomb WW, Juhas RM, Thomsen DR, Homa FL, Burch AD, Weller SK, Brown JC (2001). **The UL6 gene product forms the portal for entry of DNA into the herpes simplex virus capsid.** *Journal of Virology*; Vol. 75, no. 22, 10923-32; doi: 10.1128/JVI.75.22.10923-10932.2001
6. D Bouard, N Alazard-Dany, and F-L Cosset (2009). **Viral vectors: from virology to transgene expression.** *British Journal of Pharmacology*; Vol. 157, no. 2, 153–165; doi: 10.1038/bjp.2008.349
7. Y. Saeki, C. Fraefel, T. Ichikawa, X. Breakefield, A. Chiocca (2001). **Improved Helper Virus-Free Packaging System for HSV Amplicon Vectors Using an ICP27-Deleted, Oversized HSV-1 DNA in a Bacterial Artificial Chromosome.** *Molecular Therapy*, Vol. 3, no. 4, 591-601; doi:10.1006/mthe.2001.0294
8. A.L. Epstein (2009). **HSV-1-derived amplicon vectors: recent technological improvements and remaining difficulties - A Review.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 104, no. 3, 399-410.
9. Alberto L Epstein (2005). **HSV-1-based amplicon vectors: design and applications.** *Gene Therapy*, Vol. 12, S154–S1581; doi: 10.1038/sj.gt.3302617
10. Robin H Lachmann (2004). **Herpes simplex virus-based vectors.** *International journal of experimental pathology*, Vol. 85, no. 4, 177–190; doi: 10.1111/j.0959-9673.2004.00383.x
11. P. Marconi, R Argnani, A. L. Epstein, R. Manservigi, (2009). **HSV as a Vector in Vaccine Development and Gene Therapy.** *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 118–144. doi:10.1007/978-1-4419-1132-2_10
12. M. Sena-Esteves, Y. Saeki, C. Fraefel, and X. O. Breakefield (2000) **HSV-1 Amplicon Vectors—Simplicity and Versatility.** *Molecular therapy* Vol. 2, No. 1, July 2000 doi:10.1006/mthe.2000.0096
13. S. de Silva, W. J. Bowers (2009) **Herpes Virus Amplicon Vectors.** *Viruses*, vol. 1, no. 3, 594-629; doi: 10.3390/v1030594.

14. D.L. Glauser, M. Ackermann, O. Saydam, C. Fraefel (2006) **Chimeric Herpes Simple Virus/Adeno-Associated Virus Amplicon Vectors**. *Current Gene Therapy*, 2006, 6, 315-324 315
15. Y. Wang, C. Fraefel, F. Protasi, R. A. Moore, J. D. Fessenden, I. N. Pessah, A. DiFrancesco, X. Breakefield, and P. D. Allen (2000). **HSV-1 amplicon vectors are a highly efficient gene delivery system for skeletal muscle myoblasts and myotubes**. *American Journal of Physiology*, Vol. 278, no. 3, 619-626; doi: 10.1152/ajpcell.2000.278.3.C619
16. A.S. Laimbacher, C. Fraefel (2014) **HSV-1 Amplicon Vectors as Genetic Vaccines** *Herpes Simplex Virus: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 1144, DOI 10.1007/978-1-4939-0428-0_7
17. Epstein, A., Marconi, P., Argnani, R., & Manservigi, R. (2005). **HSV-1-Derived Recombinant and Amplicon Vectors for Gene Transfer and Gene Therapy**. *Current Gene Therapy*, 5(5), 445–457. doi:10.2174/156652305774329285
18. A. S Laimbacher, L. Esteban, A. A Castello, J. C Abdusetir Cerfoglio, M. H Argüelles, G. Glikmann, A. D’Antuono, N. Mattion, M. Berois, J. Arbiza, M. Hilbe, E. M Schraner, M. Seyffert, C. Dresch, A. L. Epstein, M. Ackermann, C. Fraefel. (2012) **HSV-1 Amplicon Vectors Launch the Production of Heterologous Rotavirus-like Particles and Induce Rotavirus-specific Immune Responses in Mice**. *Molecular Therapy*, Vol. 20 no. 9, 1810–1820.
19. A. M. Blanc, M. B. Berois, L. M. Tomé, A. L. Epstein, J. R. Arbiza (2012) **Induction of humoral responses to BHV-1 glycoprotein D expressed by HSV-1 amplicon vectors** *J. Vet. Sci.*, 13(1), 59-65 doi: 10.4142/jvs.2012.13.1.59
20. S.Nandi, Ujjwal K.De, Sumit Chowdhury (2011) **Current status of contagious ecthyma or orf disease in goat and sheep—A global perspective** *Small Ruminant Research*, vol. 96, no. 2–3, 73-82; doi: 10.1016/j.smallrumres.2010.11.018.
21. A. Nougairede, C. Fossati, N. Salez, S. Cohen-Bacrie, L. Ninove, F. Michel, S. Aboukais, M. Buttner, C. Zandotti, X. de Lamballerie, and R. N. Charrel (2013) **Sheep-to-human transmission of Orf virus during Eid al-Adha religious practices, France**. *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 19, no. 1, 102–5; doi: 0.3201/eid1901.120421.
22. Zhao, K.; Song, D.; He, W.; Lu, H.; Zhang, B.; Li, C.; Chen, K.; Gao, F. (2010) **Identification and phylogenetic analysis of an Orf virus isolated from an outbreak in sheep in the Jilin province of China**. *Vet. Microbiol.* 2010, 142, 408–415.
23. Segovia D., Haouz A., Porley D., Olivero N., Martínez M., Mariadassou M., Berois M., André-Leroux G. & Villarino A. (2017) **OH1 from Orf virus: A new tyrosine phosphatase that displays distinct structural features and triple substratespecificity**, *Journal of Molecular Biology* (2017), doi:10.1016/j.jmb.2017.07.017
24. K. Mowen, M. David (2000) **Regulation of STAT1 Nuclear Export by Jak1** *Molecular and Cellular Biology*. 2000 Oct; 20(19): 7273–7281. doi: 10.1128/mcb.20.19.7273-7281.2000
25. D. Porley (2017) **Tesis de maestría en Ciencias Biológicas: Expresión en células HeLa de la única fosfatasa de fosfo-tirosina del virus Orf: hacia la validación de interactores**. Sección Virología - Sección Bioquímica, Facultad de Ciencias, Universidad de la República.

26. N. Singh, Z. Chen, N. Tomer, S. R. Wickramasinghe, N. Soice, S. M. Husson (2008) **Modification of regenerated cellulose ultrafiltration membranes by surface-initiated atom transfer radical polymerization.** *Journal of Membrane Science* 311 (2008) 225–234. doi: 10.1016/j.memsci.2007.12.036
27. L. Kittigul, P. Khamoun, D. Sujirarat, F. Utrarachkij, K. Chitpirom, N. Chaichantanakit, K. Vathanophas (2001) **An Improved Method for Concentrating Rotavirus from Water Samples.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*; Vol. 96; no. 6; 815-821; doi: /10.1590/S0074-02762001000600013
28. M. Margenat (2016) **Fosfatasas en tirosina de Mycobacterium tuberculosis: avances en la identificación de sustratos y posible rol en la adaptación de la bacteria al macrófago.** Facultad de Ciencias, Universidad de la República.
29. **User Guide Centriprep® Centrifugal Filter Devices - Merck Millipore Ltd. - PR04321, Rev. A, 09/13**
30. P. Stiefel, S. Schmidt-Emrich, K. Maniura-Weber, Q Ren (2015) **Critical aspects of using bacterial cell viability assays with the fluorophores SYTO9 and propidium iodide.** *BMC Microbiology*; Publicado online 18 Feb 2015; doi: 10.1186/s12866-015-0376-x