

ADAPTACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR BHK-21 A CRECIMIENTO EN SUSPENSIÓN PARA LA GENERACIÓN DE LÍNEAS RECOMBINANTES PRODUCTORAS DE VLPS DEL VIRUS DE LA RABIA

Garay Ernesto

Laboratorio de Desarrollo Biotecnológico
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas
Universidad Nacional del Litoral

Área: Ciencias Biológicas
Sub-Área: Biotecnología
Grupo: X

PALABRAS CLAVE: VIRUS-LIKE PARTICLE, VACUNA, RABIA

INTRODUCCIÓN

La rabia es la infección viral aguda más severa en humanos, con una tasa de fatalidad de aproximadamente 100% una vez que aparecen los síntomas clínicos. El único tratamiento disponible es la administración de vacuna antirrábica en múltiples dosis (Jackson, 2013). El 99% de las infecciones en humanos se deben a la mordedura por perros infectados, por lo que la profilaxis de animales de compañía es muy importante para evitar la propagación de la enfermedad. La producción de la vacuna veterinaria involucra la infección de células BHK-21 y posterior inactivación química de los virus generados. Como alternativa a las vacunas a virus completos surgen las vacunas recombinantes, de las cuales toman mucha importancia las *Virus-like Particles* (VLPs) que son partículas autoensamblables que se asemejan en su estructura a la de los virus nativos pero que no contienen material genético y por lo tanto no poseen capacidad infectiva. El objetivo del presente trabajo es generar VLPs del virus de la rabia (RV-VLPs) mediante la expresión de la glicoproteína G de envoltura de dicho virus en células BHK-21 como candidato vacunal. Esta plataforma no requiere el uso del virus activo en ningún momento y por lo tanto tampoco una infraestructura de bioseguridad elevada. Con el objetivo de desarrollar un proceso con elevada productividad, es de interés la aplicación de cultivos en suspensión, que pueden alcanzar densidades celulares mucho mayores que los cultivos adherentes normalmente utilizados para la producción de esta. A su vez, esto posibilita el escalado de la producción utilizando biorreactores, a la vez que se elimina la necesidad de utilizar suero fetal bovino (SFB).

OBJETIVOS

Adaptar a crecimiento en suspensión la línea celular BHK-21 y generar líneas celulares recombinantes que expresen la glicoproteína G del virus de la rabia para la producción de RV-VLPs como vacuna para dicha enfermedad.

METODOLOGÍA

Adaptación a suspensión de la línea celular BHK-21

A partir de un cultivo de células BHK-21 creciendo en medio MEM con 10% SFB en frasco T25, se comenzó el proceso de adaptación a través de un reemplazo gradual de este medio por uno comercial libre de SFB (SFM, *Serum Free Medium*) diseñado para el crecimiento de éste tipo de células en suspensión. En cada condición se verificó que las células crecieran adecuadamente antes de incrementar el porcentaje de medio nuevo, hasta llegar al 100% del SFM conteniendo 2,5% SFB. A partir de allí,

Proyecto: “Desarrollo de una plataforma tecnológica para la producción de vacunas innovadoras y bioseguras”

Director del proyecto y becario: Dr. Claudio Prieto

Co-director del becario: Dr. Diego Fontana

se siguió el proceso de adaptación reduciendo gradualmente el contenido de SFB hasta llegar al 1%, donde las células en suspensión se trasladaron a un frasco Schott, cultivándolas en agitación a 140 rpm. En subcultivos posteriores se fue reduciendo el porcentaje de SFB hasta eliminarlo completamente, observándose la generación de agregados celulares grandes y grumos de células adheridas al frasco de cultivo. Para solucionar este problema se agregó dextran sulfato (DEX) en una concentración final 0,1 g/l.

Construcción de vectores de expresión para células eucariotas

Se ensamblaron partículas lentivirales (LVs) de tercera generación por transfección transiente de células HEK293T/17 con los vectores plasmídicos pRSV-REV, pMD.G, pMDLg/pRRE (Naldini y col., 1996; Dull y col., 1998) y pLV-GlycoG, plásmido que contiene la secuencia codificante de la glicoproteína G del virus de la rabia (RV). 48 hs post-transfección se cosechó el sobrenadante conteniendo las LVs, que luego de un paso de clarificación se conservaron a -70°C.

Desarrollo de líneas celulares recombinantes

Se llevaron a cabo transducciones de cultivos en suspensión, utilizando el stock de LVs producidos previamente. Para seleccionar las células recombinantes se llevó a cabo un protocolo de selección desarrollado en nuestro laboratorio (Prieto y col., 2011). Las células transducidas fueron incubadas, gradualmente, con cantidades crecientes del agente de selección, obteniéndose la línea celular recombinante sBHK-G.

Análisis de la expresión de glicoproteína G

Citometría de flujo: Se incubó una suspensión celular de sBHK-G con un anticuerpo (Ac) monoclonal anti-glicoproteína G del RV y luego con Acs anti-*mouse* conjugado al fluoróforo Alexafluor488. Posteriormente las células se analizaron con citómetro de flujo GUAVA, utilizando el software GUAVA ExpressPlus.

Microscopía de fluorescencia: Se incubaron células sBHK-G con el mismo par de anticuerpos anteriormente descrito. Se realizó una tinción diferencial de núcleos con Hoescht y las células se observaron en un microscopio de fluorescencia *Nikon ECLIPSE Ti-S, Nikon Instruments, Inc.*

Caracterización de RV-VLPs

Análisis de la expresión de RV-VLPs por ELISA sándwich: La captura se realizó con un Ac policlonal anti-RV y se incubaron las muestras y estándar en diluciones seriadas al medio. Luego se incubó con un Ac policlonal anti-RV biotinilado y finalmente con un conjugado de estreptavidina-peroxidasa (AMDEX). Se reveló con una solución de H₂O₂ y o-fenilendiamina, leyendo las absorbancias en lector de placas *Multiskan*.

Purificación de RV-VLPs por centrifugación: Se ultracentrifugó un volumen de 30 ml de sobrenadante de cultivo de sBHK-G previamente clarificado a 65.000 g por 3 h 30 min. Se resuspendió el pellet en buffer (Tris-HCl 50mM, NaCl 0,15M, EDTA 1mM, pH 7.4) y se guardó a -20°C.

RESULTADOS

Adaptación a suspensión de la línea celular BHK-21

Se obtuvo una línea celular BHK-21 adaptada a crecimiento en suspensión (sBHK-21) reemplazando el medio de cultivo por un SFM. Las células crecieron en forma adherente y con morfología normal hasta un porcentaje de SFB remanente de 2,5% (FIG 1, C). Una vez disminuido este porcentaje se observó mayor presencia de células no adheridas y formación de agregados en el sobrenadante (FIG 1, D). Con la eliminación del SFB y el agregado de DEX se logró el crecimiento de las células en forma aislada (FIG 1, E y F).

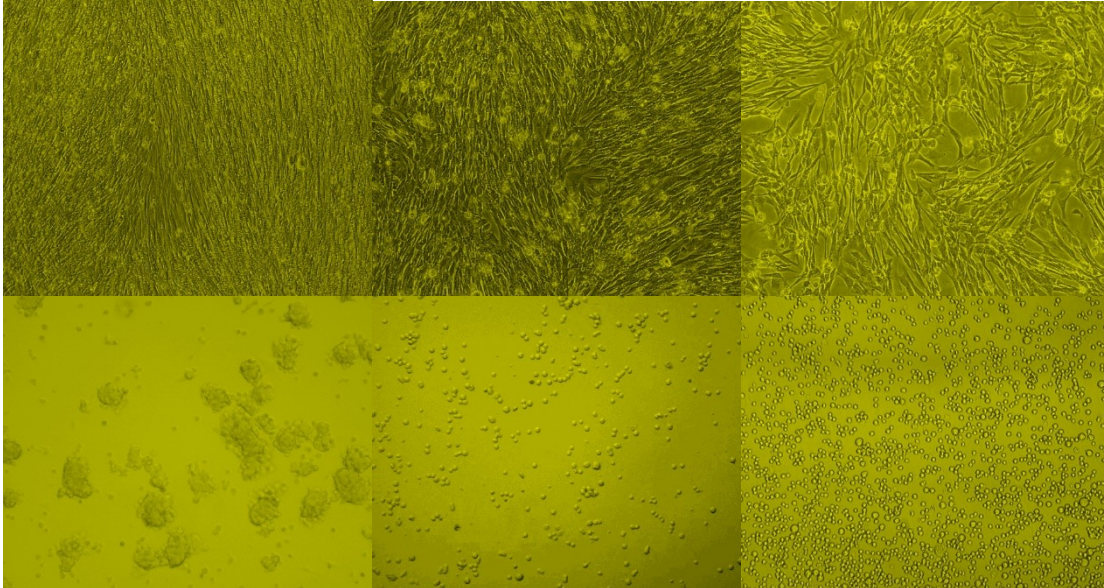


Figura 1. Microscopías de células BHK-21 durante el proceso de adaptación. A, B y C. Células cultivadas con 7,5%, 4% de SFM y 2,5% SFB respectivamente. **D.** Agregados celulares en 1% SFB sin agitación. **E.** Células aisladas en 100% SFM y agitación. **F.** Células sBHK-21 adaptadas a crecimiento en suspensión, en 100% SFM y DEX 0,1 g/l.

Generación de líneas celulares recombinantes

Se transdujeron células sBHK-21 con los LV obtenidos previamente. 48 horas post-transducción se comenzó con la presión selectiva con puromicina alcanzando una concentración de 60 $\mu\text{g/ml}$, denominándose la línea recombinante **sBHK-G**. Posteriormente, para analizar la expresión de la glicoproteína G se realizó una citometría de flujo (Fig 2, A) obteniéndose un porcentaje de 85% de células fluorescentes. Su localización subcelular fue confirmada por microscopía de fluorescencia. Se observa la correcta localización de la glicoproteína G en la membrana de las células sBHK-G (Fig 2, B y C).

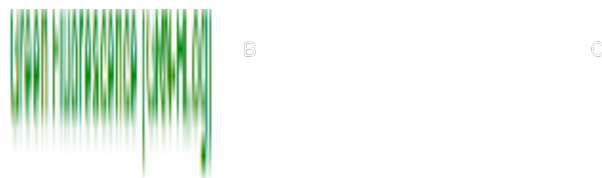


Figura 2. Análisis de expresión y localización subcelular de glicoproteína G. A. Citometría de flujo. MARKER 1: cél. negativas, MARKER 2: cél. positivas. **B y C.** Microscopías de fluorescencia Aumento 60 X, MERGED.

Caracterización de RV-VLPs

Para analizar si la línea celular sBHK-G era capaz de producir VLPs que broten al sobrenadante de cultivo, se purificaron RV-VLPs por ultracentrifugación de 30 ml de sobrenadante de cultivo. A partir de esta muestra concentrada 100 veces se llevó a cabo un ELISA sándwich específico para la detección de la glicoproteína G. Se detectaron RV-VLPs en la muestra concentrada (FIG 3).

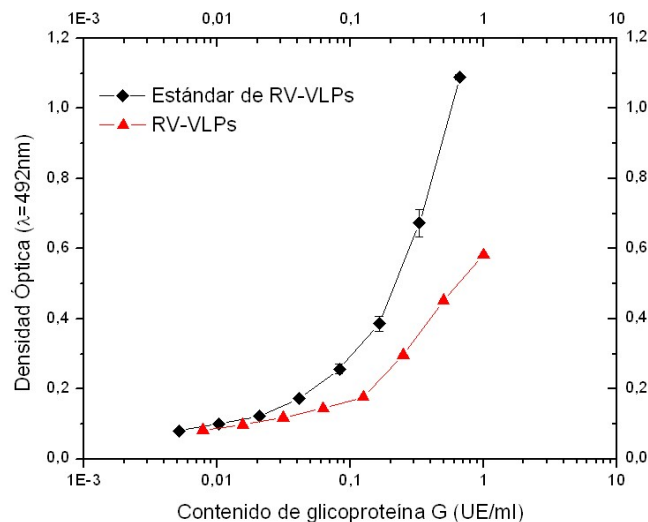


Figura 3. Detección de RV-VLPs en el sobrenadante de cultivo. ELISA de muestra concentrada del sobrenadante de cultivo de sBHK-G.

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se logró la adaptación a crecimiento en suspensión de la línea celular BHK-21. Se generaron vectores lentivirales que contienen la secuencia codificante de glicoproteína G del RV y se utilizaron para generar líneas recombinantes estables. Se comprobó la correcta expresión y localización subcelular de la glicoproteína, y a su vez se verificó su capacidad de brotación al sobrenadante de cultivo en forma de RV-VLPs.

Estos resultados pueden servir como base para establecer una plataforma de producción de vacunas bioseguras de nueva generación para la rabia.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Dull, T.; Zufferey, R.; Kelly, M.; Mandel, R. J.; Nguyen, M.; Trono, D. y Naldini, L.** 1998 A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol.* 72:8463–71.
- Jackson, A.** 2013 Current and future approaches to the therapy of human rabies. *Antiviral Res.*, 99(1):61-7.
- Naldini, L.; Blomer, U.; Gallay, P.; Ory, D.; Mulligan, R.; Gage, F. H y col.** 1996 In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science*, 272:263–7.
- Prieto, C.; Fontana, D.; Etcheverrigaray, M. y Kratje, R.** 2011 A strategy to obtain recombinant cell lines with high expression levels. *Lentiviral vector-mediated transgenesis. R. BMC Proc.*, 5(8):7.