

### Estudio de la citotoxicidad de los nanotubos formados por la proteína VP6 de rotavirus en cultivo celular.

Mabel Rodríguez González, Octavio Tonatihu Ramírez y Laura A. Palomares.

Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Ave Universidad 2001. Colonia Chamilpa. CP62210.

fax:777-3138811. email: mabel@ibt.unam.mx, laura@ibt.unam.mx.

Palabras clave: citotoxicidad, nanotubos, VP6

**Introducción.** La aplicación de los nanomateriales en la detección, separación y entrega de moléculas en sistemas biológicos es un área biotecnológica de interés. En este sentido, en nuestro grupo se ha intensificado el estudio de la proteína mayoritaria de la cápside de rotavirus VP6, la cual es muy importante desde el punto de vista médico debido a su alta inmunogenicidad. Al ser expresada de manera recombinante junto a la proteína de nucleocápside rotaviral VP2, ambas se ensamblan formando partículas pseudo virales de doble capa. Sin embargo, cuando la proteína VP6 se expresa por sí sola, se autoensambla formando nanotubos de un diámetro aproximado de 70nm y varios micrómetros de longitud o en forma de esferas, en dependencia de las condiciones de pH y fuerza iónica del medio (1). En nuestro grupo se ha caracterizado el proceso de ensamblaje y desensamblaje *in vitro* de los nanotubos de VP6, los cuales además, tienen una capacidad intrínseca de interactuar con diferentes metales como Ag, Au, Pt y Pd (2). Basándonos en estudios previos donde se sugiere que determinados aminoácidos de VP6 podrían interactuar con ácidos nucleicos, nos proponemos estudiar la capacidad de los nanotubos de VP6 para encapsular ADN plasmídico y entregarlo a células de mamífero cultivadas *in vitro*, con la finalidad de generar un nuevo candidato vacunal contra la infección por rotavirus. Como un primer paso, en este trabajo se muestra el estudio de la citotoxicidad de los nanotubos de VP6 en diferentes líneas celulares de mamífero.

**Materiales y métodos.** Los nanotubos de VP6 se produjeron infectando células de insecto con baculovirus recombinantes y colectando el sobrenadante del cultivo. La purificación de los nanotubos se llevó a cabo mediante cromatografía de intercambio aniónico y filtración en gel y la pureza del producto final se determinó mediante ensayos de SDS-PAGE y Western Blot. Los nanotubos purificados se visualizaron mediante microscopía electrónica. La citotoxicidad de los nanotubos se evaluó sembrando células de mamífero MA104 y CaCo-2 en placas de cultivo. Una vez adheridas fueron incubadas con diluciones 1/2 seriadas de los nanotubos de VP6, partiendo de 0.2 mg/mL. Posteriormente, el sobrenadante se eliminó y las células se mantuvieron en cultivo durante 72 horas. La viabilidad celular se evaluó mediante la adición de MTT y posterior lectura de la densidad óptica a 570nm (3).

**Resultados y discusión.** Los nanotubos de VP6 se obtuvieron con un alto porcentaje de pureza (%) y se visualizaron de manera exitosa en el microscopio electrónico de barrido (Fig.1). Al ser adicionados a dos líneas celulares de mamífero cultivadas *in vitro* demostraron ser no citotóxicos.

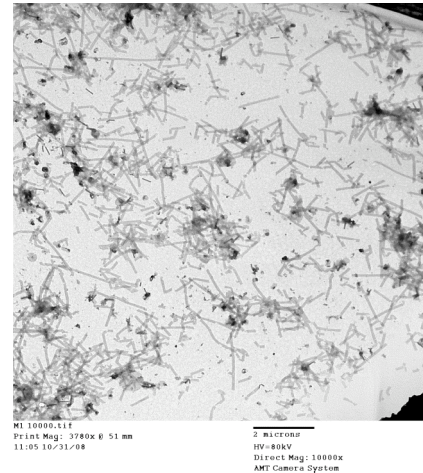


Fig. 1. Nanotubos de VP6 teñidos con acetato de uranilo y visualizados mediante microscopía electrónica.

**Conclusiones.** Los nanotubos de VP6 demostraron ser no citotóxicos al ser adicionados a las líneas celulares de mamífero CaCo-2 y MA104 a las concentraciones analizadas.

Estos ensayos constituyen un primer paso en la aplicación de estas estructuras como un sistema acarreador de biomoléculas.

**Agradecimiento.** Conacyt -Salud 2007-c01-69911. Beca de Doctorado Conacyt.

#### Bibliografía.

1. Mena JA, Ramírez OT, Palomares LA. (2006) Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *J Biotechnol*, 122:443-52.
2. Plascencia, G. Saniger, JM, Ramírez OT, Palomares (2009) Use of recombinant rotavirus VP6 as a multifunctional template for the synthesis of nanobiomaterials functionalized with metals. En preparación.
3. Kumar SR, Ahmed V.P.I, Parameswaran V, Sudhakaran R, Babu VS, Hameed S. (2008) Potential use of chitosan nanoparticles for oral delivery of DNA vaccine in Asian sea bass (Lates calcarifer) to protect from *Vibrio* (Listonella) anguillarum. *Fish & Shellf Immun*, 25:47-56.