



RECUPERACION DE PSEUDO-PARTICULAS DE DOBLE CAPA DE ROTAVIRUS UTILIZANDO SISTEMAS COMPLEJOS DE DOS FASES ACUOSAS

Jorge Benavides, Jimmy A. Mena*, Laura A. Palomares*, Octavio Tonatiuh Ramírez*, Marco Rito-Palomares. Centro de Biotecnología, ITESM Campus Monterrey, Eugenio Garza Sada 2501, C.P. 64849, Monterrey, N.L. México.

*Instituto de Biotecnología, UNAM. Fax: 83 58 2000 Ext. 4842. E-mail: mrito@itesm.mx

Palabras clave: pseudo-partículas virales, recuperación, sistemas de dos fases acuosas.

Introducción. Las pseudo-partículas virales tienen un amplio rango de aplicación (vacunas, terapia génica, nanomateriales, etc) (1). Sin embargo los procesos de recuperación y purificación son generalmente costosos y largos, e inclusive en muchas ocasiones las etapas involucradas no son fácilmente escalables.

Los sistemas de dos fases acuosas han demostrado ser capaces de recuperar y purificar productos biotecnológicos eficientemente, aun de matrices con una gran cantidad de contaminantes o partículas suspendidas (restos celulares). Adicionalmente es una técnica fácilmente escalable y relativamente económica (2).

El objetivo de este trabajo es evaluar la factibilidad de recuperar y purificar pseudo-partículas de doble capa de rotavirus (dRRLP) producidas por el sistema de expresión células de insecto – baculovirus, utilizando como etapa primaria de recuperación sistemas de dos fases acuosas polietilenglicol - sal.

Metodología. Células de insecto High Five fueron cultivadas e infectadas simultáneamente con el baculovirus codificando la proteína de fusión EGFPVP2 y con otro codificando para VP6 de la cepa SA11. A las 48 horas postinfección se centrifugó el cultivo. Aproximadamente el 60% de las dRRLP se encontraron en el sobrenadante y 40% en la biomasa. Ambas fracciones fueron manejadas por separado. Los sistemas de dos fases acuosas fueron formados utilizando el homogenizado de ruptura celular (obtenido por sonicación de la biomasa), o bien el sobrenadante de caldo de cultivo. Diferentes parámetros (peso molecular del polímero, relación de volúmenes, cantidad de muestra alimentada, etc) fueron variados para estudiar la influencia de cada uno de estos parámetros sobre la partición de dRRLP en el sistema. La detección de las dRRLP se hizo mediante HPLC – Detector de fluorescencia. También se detectó proteína total mediante arreglo de fotodiodos a 280 nm.

Resultados y discusión. En los sistemas que se alimentaron con homogenizado de ruptura celular se encontraron dRRLP tanto en la fase superior como en la interfase, sin embargo de esta última no fue posible recuperarlas directamente debido a la acumulación de restos celulares. Los mejores porcentajes de recuperación se obtuvieron al utilizar polietilenglicol 400 g/gmol, fosfato de potasio, pH 7 y relación de volúmenes elevada. Se logró recuperar 47% de las dRRLP alimentadas al sistema en una sola etapa, y al utilizar dos sistemas de fases acuosas en serie con las mismas características (alimentando el segundo sistema con la interfase del primero) se logró

recuperar hasta un 90% de las dRRLP alimentadas al primer sistema (47% y 43% en el primer y segundo sistema de fases acuosas, respectivamente).

Las dRRLP provenientes de sobrenadante de caldo de cultivo fueron recuperadas en la interfase de sistemas de dos fases acuosas con polietilenglicol 3350 g/gmol, fosfato de potasio, pH 7 y relación de volúmenes cercana a 1, siendo estas condiciones en las cuales se obtuvo la mejor recuperación (80% de las dRRLP alimentadas, en una sola etapa).

Tomando en cuenta los máximos porcentajes de recuperación obtenidos (90% de biomasa y 80% de sobrenadante) se calculó una recuperación global de dRRLP del 84%.

Cuadro 1. Porcentaje de recuperación y pureza de dRRLP en sistemas de dos fases acuosas polietilenglicol - sal

Característica	Biomasa	Sobrenadante
Peso molecular del polímero	400 g/gmol	3350 g/gmol
Longitud de línea de corte (LLC)	35 %p/p	17 % p/p
Relación de volumen (V_R)	13.0	1.0
Fase del sistema en que se recuperó dRRLP	Superior	Interfase
Recuperación dRRLP (número de etapas en serie)	47% (1 etapa) 90% (2 etapas)	80% (1 etapa)
Pureza dRRLP recuperado	11.0%	6.4%

Conclusiones. Los sistemas de dos fases acuosas polietilenglicol – fosfato de potasio demostraron ser un método adecuado para la recuperación primaria de dRRLP, tanto a partir de homogenizado de ruptura celular como de sobrenadante de caldo de cultivo. Se obtuvo una recuperación global de dRRLP del 84% (considerando ambas fracciones) y purezas entre 6.4 y 11.0 %.

Agradecimiento. Se agradece a la Cátedra de Investigación ITESM (CAT005), UNAM-PAPIIT ES-218202 y IN-223805, y CONACyT-SAGARPA 103.

Bibliografía.

- Flynn, C.E., Lee, S.W., Peelle, B.R., and Belcher, A.M. (2003). Viruses as vehicles for growth, organization and assembly of materials. *Acta Materialia*. 51: 5867-5880.
- Rito-Palomares M, Middelberg APJ. (2002). Aqueous two-phase systems for the recovery of a recombinant viral coat protein from *Escherichia coli*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77: 1025-1029.