



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



ESTUDIO DE LA INTERNALIZACIÓN DE LOS NANOTUBOS FORMADOS POR LA PROTEÍNA VP6 DE ROTAVIRUS EN CÉLULAS DE MAMÍFERO.

Mabel Rodríguez, Christopher Wood, Rosana Sánchez López, Octavio Tonatiuh 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: internalización, nanotubos, VP6

Introducción. La utilización de macromoléculas para la entrega de material genético al interior de una célula es un área en desarrollo de la biotecnología actual. Varios grupos de investigación han reportado el uso de proteínas de la cápside de virus de papiloma humano y poliomavirus BK como acarreadores de ADN (1,2). Formando parte de la cápside de los rotavirus se encuentra la proteína VP6, la cual es altamente inmunogénica y muestra un polimorfismo estructural. Esta proteína es capaz de autoensamblarse 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 (3). 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 agente acarreador de biomoléculas. En este trabajo se muestran los estudios de internalización de los nanotubos de VP6 en las líneas celulares de macrófagos THP1 y J774.

Metodología. La proteína VP6 se produjo de manera recombinante utilizando el sistema de células de insecto-baculovirus. Los nanotubos se purificaron siguiendo el protocolo reportado por Mena (4). Los macrófagos se sembraron a una densidad de 10^5 células por pozo en placas LabTek (Nunc) y luego de ser activados con el éster de forbol PMA (Merck), se incubaron junto con los nanotubos de VP6 durante varios tiempos. La influencia de los nanotubos de VP6 sobre la viabilidad celular se analizó mediante la adición del MTT (Sigma) al medio de cultivo y la presencia de VP6 en el interior de las células se visualizó mediante microscopía de fluorescencia con anticuerpos específicos por esta proteína.

Resultados. En la Fig. 1 se muestra la influencia de la adición de los nanotubos de VP6 en la viabilidad de las células THP1. En la Fig.2 podemos observar la internalización de los nanotubos de VP6 al ser incubados durante 4h con las líneas celulares de macrófagos THP1 y J774.

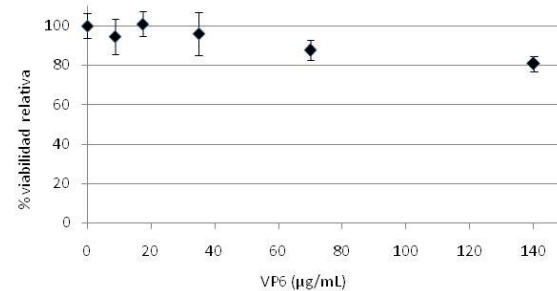


Fig. 1. Influencia de los nanotubos de VP6 sobre la viabilidad relativa de las células THP1. El % de viabilidad se calculó respecto a las células sin VP6.

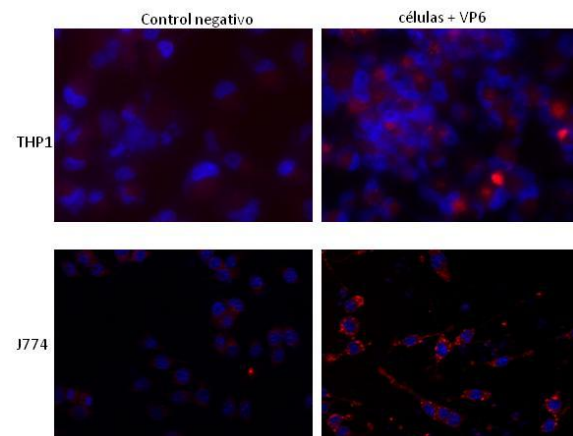


Fig.2. Internalización de los nanotubos de VP6 en las líneas celulares de macrófagos THP1 y J774. En azul se muestran los núcleos celulares y en rojo se muestra la señal proveniente de los nanotubos de VP6.

Conclusiones. Los nanotubos de VP6 mostraron baja toxicidad al ser incubados con la línea celular de macrófagos THP1 y fueron capaces de ser internalizados por estas células, así como por la línea celular J774.

Agradecimientos. Conacyt CB-101847. Conacyt Salud-69911.DGAPA IN-224409. Dr. Y, Rosenstein Azoulay. Dr. N.A, Valdez Cruz. M.C. V, Hernández. M.C. R, Pastor. Beca de Doctorado de Conacyt.

Bibliografía.

- 1- Touzé A, Coursaget P. (1998). *Nucl Ac Res*, 26 (5):1317-1323.
- 2- Touzé A, Bousarghin L, Ster C, Combata AL, Roingard P, Coursaget P. (2001). *J Gen Virol*,82(Pt 12):3005-9.
- 3- Lepault J, Petitpas I, Erk I, Navaza J, Bigot D, Dona M, Vachette P, Cohen J, Rey FA. (2001). *EMBO J*, 20(7):1498-507.
- 4- Mena Y. (2007). Tesis de Doctorado, IBT, UNAM.