



XIV Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería



EFFECTO DE LAS ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO SOBRE MACROESTRUCTURAS PROTEICAS VIRALES DE ROTAVIRUS

Ricardo Castro-Acosta, Octavio Tonatiuh Ramírez, Laura A. Palomares.

Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Avenida Universidad 2001 Col. Chamilpa Cuernavaca Morelos C.P. 62210, Fax: (777)-3138811, rcastro@ibt.unam.mx, laura@ibt.unam.mx
Palabras clave: Sistema de células de insecto baculovirus (SC-BV), especies reactivas de oxígeno (EROs).

Introducción. Las especies reactivas de oxígeno (EROs) son compuestos de oxígeno que tienen un electrón desapareado, lo que los hace altamente reactivos. Las EROs son producidas en el organismo principalmente por la cadena de transporte de electrones y provocan daño en las proteínas, material genético y lípidos. A nivel proteico, las EROs ocasionan modificaciones estructurales y conformacionales al oxidar aminoácidos, lo que produce cambios en las características bioquímicas de las proteínas. Las proteínas virales son capaces de autoensamblarse en macroestructuras de diversos tipos, las que pueden utilizarse como inmunógenos. VP6 de rotavirus es una proteína polimórfica capaz de ensamblarse en estructuras idénticas al virus nativo o de formar otro tipo de macroestructuras, como nanotubos. Es posible que la oxidación por EROs altere el ensamblaje o el plegamiento de VP6, lo que repercutiría en su capacidad inmunogénica y estructural. En este estudio se evaluó el efecto de las especies reactivas de oxígeno en VP6 monomérica y ensamblada en tubos para desarrollar mejores estrategias de producción de estas partículas.

Metodología. Los tubos de VP6 se produjeron infectando células de insecto High Five® con un baculovirus que codifica para la proteína VP6 de rotavirus. La infección se llevó a cabo en matraces de 1L (volumen de operación de 250 mL) a una concentración celular de 0.5×10^6 cel/mL y una multiplicidad de infección (MDI) de 1 ufp/cel. Se utilizó H_2O_2 y $\cdot OH$ como oxidantes a diferentes concentraciones. El grado de oxidación se determinó con el kit Oxyblot™. Por SDS-PAGE y Western blot se evaluó el efecto de la oxidación sobre la proteína. Se utilizó GP(permeación en gel)-HPLC para observar la presencia de macroestructuras y realizar cinéticas de ensamblaje y desensamblaje. Se confirmó la presencia de macroestructuras (tubos) por micrografía electrónica de transmisión.

Resultados. Se observó un incremento en la oxidación de la proteína VP6 tanto monomérica como ensamblada en tubos a medida que se incrementó la concentración de ambos oxidantes (tiempos de oxidación de 0.25 a 6 h). Los radicales $\cdot OH$ a concentraciones mayores de 10 mM y tiempos de oxidación de 0.25 h provocaron la

degradación de la proteína VP6 monomérica, mientras que en los tubos de VP6, sólo se observó degradación a tiempos de oxidación mayores a 1 h. Se siguió la cinética de oxidación de los tubos de VP6 a 5 mM de $\cdot OH$ siguiendo la pérdida de absorbancia a 280 nm y fluorescencia de triptófanos. Se observó un comportamiento de decaimiento exponencial de primer orden en la pérdida de absorbancia. Por otra parte, la oxidación de la proteína monomérica (1 y 5 mM de $\cdot OH$) no resultó en la pérdida de la capacidad de ensamblaje de VP6 aunque la estructura de los nanotubos fue diferente (Figura 1).

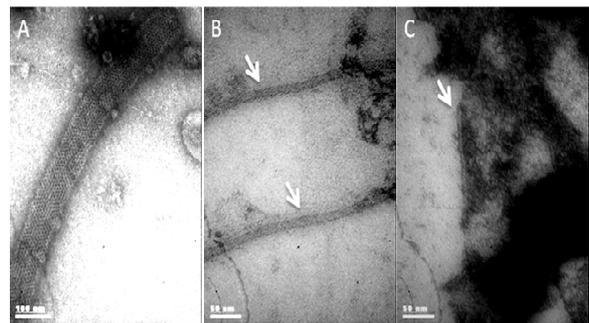


Figura 1. Resultados de la reacción de re-ensamblaje de VP6 oxidada. A) Control sin oxidar, 140K. B) Proteína oxidada con 1 mM de $\cdot OH$, 250K. C) Proteína oxidada con 5 mM de $\cdot OH$, 250K.

Conclusiones. En este trabajo se determinó que los monómeros de VP6 son más susceptibles a oxidación que los tubos de VP6 y que por arriba de 10 mM de $\cdot OH$ existe degradación de la proteína. También se observó que los tubos son estables a concentraciones menores de 10 mM $\cdot OH$ y que la proteína oxidada no pierde la capacidad de ensamblaje aunque forma macroestructuras distintas.

Agradecimientos. Conacyt-Salud 69911, DGAPA-UNAM-IN 224409, Conacyt-SEP 101847 y al apoyo técnico de Vanessa Hernández, Ruth Pastor y G. Zavala, Unidad de microscopía electrónica del IBT-UNAM.

Bibliografía.

- Plascencia-Villa, G., Saniger, J.M., Ascencia, J.A., Palomares, L.A., Ramírez, O.T. 2009. *Biotechnol Bioeng.* 104(5): 871-881.
- Imlay J.A. (2003). *Ann rev microbiol.* 57: 395-418.
- Wang, Y., Oberley, L.W., Murhammer, D.W. 2001. *FRBM.* 31:1448.