

Expresión de α -latrotoxina Recombinante Activa de *Latrodectus mactans* Utilizando el Sistema de Células de Insecto-Baculovirus.

Mabel Rodríguez, Mónica Prud'Homme, Alejandro Alagón, Roberto Stock*.

*Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Avenida Universidad 2001. Colonia Chamilpa, CP 62210. Cuernavaca, Morelos. *Autor correspondiente: rstock@ibt.unam.mx*

RESUMEN

Las arañas conocidas como viudas pertenecen al género *Latrodectus*, dentro del cual se han descrito 40 especies. Entre ellas se encuentra *Latrodectus mactans*, que se distribuye por todo México. El veneno de la viuda negra contiene varios componentes, dentro de los que se encuentra una proteína de 130 kDa denominada α -latrotoxina (α LTX), responsable de los síntomas de envenenamiento en vertebrados. El tratamiento más efectivo contra la mordedura de la viuda negra es la administración de antiveneno. En 1999, el Instituto Bioclon en colaboración con el Instituto de Biotecnología de la UNAM lanzó al mercado mexicano el antiveneno Aracmyn[®], el cual se compone de fragmentos F(ab')₂ de inmunoglobulinas policlonales de caballos inmunizados con veneno de *L. mactans*. El proceso de obtención del veneno es muy riesgoso y poco eficiente, por lo que en nuestro laboratorio se clonó y secuenció el gen de la α LTX de *L. mactans* con el objetivo de expresarla de manera recombinante y utilizarla como un inmunógeno sustituto del veneno en la producción del antiveneno Aracmyn[®]. Para expresar la α LTX recombinante subclonamos su cADN en el vector de transferencia baculoviral pMelBacA y esta construcción fue cotransfectada en células de insecto Sf9 junto con ADN de baculovirus. Al infectar células de insecto H5 con los virus recombinantes, logramos expresar la α LTX, la cual se purificó parcialmente mediante cromatografía de intercambio aniónico en un sistema de FPLC. La α LTX recombinante mantuvo su toxicidad y al inmunizar conejos estos desarrollaron una respuesta de anticuerpos capaces de reconocer al veneno nativo de *L. mactans*. Nuestros esfuerzos futuros estarán dirigidos a la optimización del proceso de purificación de la α LTX recombinante.

Palabras clave: latrotoxina, antiveneno, anticuerpos.

ABSTRACT

Envenomation caused by black widow spider bite is a health hazard in México and it is known that α -latrotoxin, a 130 kDa protein isolated from the venom of various species of black widow is responsible for all envenomation symptoms. *Latrodectus mactans* is the most common species of black widow spider found in Mexico, and the α -latrotoxin gene from this species was cloned. Since 1999, the Bioclon Institute together with the Biotechnology Institute of UNAM, developed the antivenom Aracmyn[®], which is composed of F(ab')₂ fragments, obtained from the blood of horses

immunized with the venom of *Latrodectus mactans*. This process is expensive and it requires large amounts of spiders to obtain the venom for each immunization, which is why we decided to obtain a heterologously expressed recombinant α -latrotoxin and use it as an immunogen for the production of the antivenom Aracmyn[®]. Using the insect-cell baculovirus system we expressed the recombinant toxin, which maintained the toxicity of the natural venom and, when it was injected into rabbits, elicited an antibody specific response against the venom of *Latrodectus mactans*. Our future efforts will aim at an improvement of the purification process of the recombinant toxin.

Keywords: latrotoxin, antivenom, antibody.

INTRODUCCIÓN

La araña conocida como viuda negra o araña capulina pertenece al género *Latrodectus* y se distribuye a través de todo el mundo (Platnick, 1993 y 1997). Existen dentro de este género 40 especies descritas, dentro de las cuales se encuentra la especie más común en México: *Latrodectus mactans*. El veneno de la viuda negra es 15 veces más tóxico (por peso) que el veneno de una víbora de cascabel y produce un síndrome neurotóxico conocido como latrodectismo. Los síntomas más comunes son: dolor en la zona de la mordedura, vómitos, náuseas, lipotimias y dificultad para respirar. En muy pocos casos (menos del 1%) se han reportado fallecimientos, siendo los niños y ancianos el grupo más afectado.

La caracterización del veneno de *L. mactans* mostró la existencia de una familia de proteínas relacionadas pero selectivamente tóxicas para los vertebrados, insectos o crustáceos: α -latrotoxina, α -latroinsectotoxina y α -latrocrustatoxina, respectivamente (Granata *et al.*, 1972; Frontali *et al.*, 1976; Knipper *et al.*, 1986). La α -latrotoxina (α LTX) es la proteína que afecta a los vertebrados y

está compuesta por una sola cadena polipeptídica no glicosilada de 130 kDa (Ashton *et al.*, 2000). Se ha propuesto que el mecanismo de acción de la α LTX requiere su inserción en la membrana plasmática de las terminales neuronales presinápticas de los vertebrados, causando una liberación masiva de prácticamente todos los neurotransmisores conocidos como la acetilcolina, GABA y norepinefrina. Se ha demostrado que la acción de la toxina altera las propiedades de conducción de la membrana y desencadena la liberación de los neurotransmisores almacenados en las vesículas presinápticas (Rosenthal y Meldolesi, 1989; Liu y Misler, 1998; Lang *et al.*, 1998).

Para el tratamiento de los pacientes mordidos por la viuda negra se han utilizado diversos fármacos, pero el tratamiento más efectivo ha sido la administración de antiveneno. En México desde el año 1999 el Instituto Bioclon en colaboración con el Instituto de Biotecnología de la UNAM lanzó al mercado el antiveneno Aracmyn[®], el cual se compone de fragmentos F(ab')₂ de inmunoglobulinas policlonales de caballos inmunizados con veneno de *L. mactans*. Para la inmunización de los caballos se necesita el

veneno de cientos de arañas, el cual se obtiene mediante estimulación eléctrica. La obtención del veneno es una actividad onerosa y conlleva riesgos que comprometen tanto la calidad del veneno como la salud del trabajador. Es por esto que nuestro grupo se dio a la tarea de expresar la α -latrotoxina de la especie *L. mactans* de manera recombinante con el objetivo de utilizarla como inmunógeno sustituto del veneno en la producción del antiveneno Aracmyn[®]. Es importante señalar que el proceso de fabricación de un antiveneno no hace uso del veneno solamente para la inmunización de los animales de producción, una parte igualmente importante del mismo se utiliza para el control de calidad del antiveneno y de ahí la importancia de obtener preparaciones de α LTX recombinante con potencias tóxicas comparables a la del veneno natural.

MATERIALES Y MÉTODOS

Medios de cultivo

Para los experimentos de cotransfección se utilizó el medio de cultivo Grace's Insect Medium y el medio TNM-FH (Grace's Insect Medium suplementado con hidrolizado de lactalbúmina y extracto de levadura) al 10% de suero de ternera fetal (STF) y 0.5% de pluronic F-68 (Sigma). Para la titulación de los virus recombinantes se utilizó el medio TNM-FH y la clonación y amplificación de las placas virales, así como la producción de proteína recombinante, se realizó con el medio de cultivo Sf-900 II SFM libre de suero. Todos estos reactivos fueron de GIBCO-Invitrogen. El

sustrato cromogénico para la detección de α LTX recombinante por ensayos de *Western Blot* fue el BCIP-Na (sal sódica del 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato) junto a una solución de NBT (azul de tetrazolio), ambos de Zymed. Los reactivos de uso general fueron de Sigma, Merck, GIBCO BRL, Qiagen, BioRad y Rockland.

Animales

Se utilizaron conejos *New Zealand White* (NZW) y ratones CD1, obtenidos del bioterio del Instituto de Biotecnología, UNAM.

Clonación del cADN de la α LTX en el vector pMelBacA

Para lograr este objetivo partimos de un plásmido obtenido en nuestro laboratorio que tenía insertada la secuencia codificante de la α LTX madura. A partir de esta construcción, denominada pCR2.1 TOPO- α LTX, subclonamos el cADN de la α LTX en el vector pMelBacA, con el objetivo de cotransfectarlo a células de insecto junto con ADN de baculovirus. El cADN de la α LTX subclonado queda fusionado con la secuencia que codifica para el péptido señal de la melitina, que forma parte del vector pMelBacA. Esta secuencia permite la posterior secreción de la proteína recombinante al sobrenadante de cultivo.

Los vectores pCR2.1-TOPO- α LTX y pMelBacA (Invitrogen) fueron digeridos con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Sal* I (*New England Biolabs*). Posteriormente el vector pMelBacA fue desfosforilado utilizando Fosfatasa Alcalina (Roche) para prevenir la autoligación del mismo. Los fragmentos de la

digestión se separaron mediante una electroforesis en gel de agarosa y las bandas de interés se cortaron del gel y se purificaron para su posterior ligación a 16°C durante 20 h. El producto de la ligación fue transformado en células de *E. coli* XL2 Blue (Stratagene) siguiendo el protocolo sugerido por los proveedores.

Luego de purificar el ADN plasmídico de varias colonias transformantes utilizando el *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche), seleccionamos las colonias positivas para la construcción pMelBacA- α LTX mediante un análisis de restricción. El ADN plasmídico correspondiente a las colonias que mostraron el patrón de restricción esperado fue secuenciado utilizando oligonucleótidos que hibridan a lo largo del cADN que codifica para la α LTX y que fueron sintetizados en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Obtención de los baculovirus recombinantes

Células de insecto Sf9 (ATCC CRL-1711), provenientes del ovario de pupa del lepidóptero *Spodoptera frugiperda* fueron cotransfectadas con el plásmido pMelBacA- α LTX y con el ADN de baculovirus *Bac-N-Blue* siguiendo el protocolo sugerido en el manual *Bac-N-Blue Transfection and Expression Guide* (Invitrogen). Los baculovirus recombinantes se forman a través de un proceso de recombinación homóloga que ocurre en el núcleo de las células cotransfectadas, mediante el cual el cADN de la α LTX se transfiere al genoma de los baculovirus. La

selección de los baculovirus recombinantes se realizó mediante un ensayo en placa.

Ensayo en placa

Células Sf9, cultivadas en medio TNM-FH al 10% de STF y 0.5% pluronic F-68 y con una viabilidad mayor del 97% fueron sembradas en placas de cultivo de 6 pozos de fondo plano a razón de 2×10^6 células/pozo en 3 mL totales. Se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min para permitir la adhesión de las células al fondo de los pozos y se eliminó el medio de cultivo por aspiración. Se adicionaron a los pozos la diluciones seriadas del sobrenadante de las cotransfecciones o del sobrenadante de las amplificaciones de los baculovirus, las cuales se realizaron con medio de cultivo TNM-FH al 10% STF. Las placas de cultivo se sellaron e incubaron en un agitador orbital a razón de 2 revoluciones/min durante 3 h a temperatura ambiente y en la oscuridad. Nuevamente se eliminó el medio de cultivo por aspiración y se adicionó 1 mL/pozo de una mezcla 1:1, previamente preparada y mantenida a 47°C, de agarosa de bajo punto de fusión al 3%: TNM-FH 2X, 20% STF y 300 μ g/mL de X-gal (Sigma). Las células infectadas son de color azul debido a la hidrólisis del sustrato X-gal por la enzima β -galactosidasa, la cual forma parte del genoma de los baculovirus recombinantes. Una vez que la mezcla medio-agarosa gelificó sobre las células, éstas se incubaron durante 9 días a 27°C y las placas virales recombinantes se contaron a simple vista en un transiluminador.

Para aislar y preservar las placas virales obtenidas como resultado de los ensayos en placa, se seleccionaron los grupos de células que presentaban color azul del medio con agarosa con ayuda de una pipeta Pasteur. Este tapón de agarosa fue dispersado en medio de cultivo Sf900-II al 0.5% STF y almacenado a 4°C.

Titulación de los baculovirus recombinantes

Una vez amplificados los baculovirus recombinantes en células de insecto Sf9, se realizó un ensayo en placa para determinar la cantidad de unidades formadoras de placas virales (ufp) presentes en 1 mL de sobrenadante de cultivo. Estos ensayos en placa se realizaron de manera muy similar al ensayo descrito previamente, sólo que en este caso, las células Sf9 se infectaron con diferentes diluciones de los sobrenadantes de las placas virales amplificadas.

Estudio de la cinética de expresión de la α LTX recombinante

Para la producción de α LTX recombinante se utilizó la línea celular BTI-Tn-5B1-4 (Invitrogen) conocida comercialmente como High Five™ (H5). Esta línea proviene del ovario del lepidóptero *Trichoplusia ni*. Las células de insecto H5 se infectaron con los baculovirus recombinantes variando los parámetros de multiplicidad de infección (MOI) y densidad celular inicial. Los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados a las 24, 48, 72 y 96 h post-infección y se midió la densidad y viabilidad celular por conteo en un hemocitómetro utilizando una solución de Azul

de Tripiano al 0.04%. Las proteínas presentes en el sobrenadante de cultivo se separaron por SDS-PAGE y la presencia de α LTX recombinante se determinó mediante ensayos de *Western Blot*. Como primer anticuerpo se utilizó un suero de conejo específico contra el dominio amino de la α LTX y como segundo anticuerpo se utilizó un suero de cabra específico para IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Biorad).

Purificación de la α LTX recombinante

La purificación de α LTX recombinante se realizó siguiendo el protocolo descrito por Volynski y colaboradores (1999) con algunas modificaciones. Se sembraron células H5 en medio de cultivo SF900-II a una densidad de 1×10^6 células/mL y se infectaron a una MOI de 5 con los virus recombinantes. Las células se incubaron en agitación a 26°C y luego de 48 h se les adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (*Complete mini EDTA-Free*, Roche) y se incubaron nuevamente en agitación durante 30 min a 4°C. El proceso consta esencialmente de dos pasos: primeramente se pasó el sobrenadante de cultivo por un filtro Q15 de intercambio aniónico (*Sartobind Q15*, Sartorius) y la fracción eluída del mismo con 1 M NaCl fue sometida a una cromatografía FPLC a través de una columna MonoQ. La elución se realizó con un gradiente lineal de NaCl desde 0.1 M hasta 0.5 M. Las fracciones obtenidas durante la cromatografía fueron analizadas por SDS-PAGE y *Western Blot*. La visualización del contenido total de proteínas presente en cada

fracción se realizó tiñendo los geles con nitrato de plata.

Tinción neutral de proteínas con nitrato de plata

Para la tinción de los geles con nitrato de plata se siguió el protocolo de Harlow y Lane (1988).

Western Blot

Para los ensayos de *Western Blot* las proteínas y los componentes del veneno se separaron mediante SDS-PAGE y fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). La transferencia se realizó durante 1h a 400 mA en una cámara de electrotransferencia semi-seca HEP-1 (OWL). Para la inmunodetección de la α LTX recombinante la membrana se incubó durante 1h en agitación con un suero de conejo específico por el dominio amino de la α LTX en una solución salina tamponada con Tris-HCl, 0.05% Tween 20 (TBST) y 0.1% de leche descremada. Seguidamente se realizaron 3 lavados con TBST y la membrana se incubó con un anticuerpo anti-IgG (H+L) de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed) durante 1h. El reconocimiento de la α LTX recombinante por el suero se visualizó por incubación de la membrana en una solución de BCIP y NBT al 10%. La reacción se detuvo con una solución de 5 mM EDTA.

Cuantificación de proteínas

La cuantificación de cada preparación de proteínas se hizo con el *kitMicro BCA Protein Assay Reagent* (Pierce).

Estudio de la toxicidad de la α LTX recombinante

Para evaluar la capacidad de la α LTX recombinante de producir los mismos síntomas de envenenamiento producidos por el veneno de la araña *L. mactans*, ratones de la cepa CD1 con un peso entre 18 y 20 g fueron inyectados por la vena caudal con 500 μ L del sobrenadante de cultivo de células H5 infectadas con los baculovirus recombinantes o con diferentes preparaciones de la α LTX luego del proceso de purificación. Cada cierto tiempo observamos el comportamiento de los animales y la presencia de ataxia, cierre de los párpados y contracción del lomo, que son los síntomas más frecuentes del envenenamiento producido por la mordedura de la araña viuda negra.

Inmunizaciones con la α LTX recombinante

Se inició un protocolo de inmunización de dos conejos de la cepa NZW (conejos 25 y 27) utilizando como inmunógeno tanto el sobrenadante de cultivo de células H5 infectadas con los baculovirus recombinantes como las fracciones de la purificación por MonoQ-FPLC donde se encontró la α LTX. Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar si la toxina era capaz de generar una respuesta inmune en conejos que reconociera el veneno de *L. mactans*. Las inmunizaciones se realizaron por vía subcutánea cada 8 días durante 4 meses y medio y los conejos fueron sangrados antes del inicio del protocolo y en 9 ocasiones durante el proceso de inmunización. La primera dosis se administró emulsificada en

adyuvante completo de Freund (ACF), y las dosis posteriores se administraron con adyuvante incompleto de Freund (AIF) para el conejo 25 y alternando AIF y alúmina para el conejo 27.

*Ensayo de ELISA para evaluar la respuesta inmune contra el veneno de *L. mactans* en los conejos inmunizados*

Placas Maxisorp (Nunc) fueron sensibilizadas con 100 ng/pozo del veneno de *L. mactans* en una solución de 100 mM carbonato/bicarbonato a pH 9.6 y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Los pozos se bloquearon con una solución de 50 mM Tris-HCl pH 8, 0.5% gelatina y 0.2% de Tween 20 durante 2 h a temperatura ambiente. Los sueros de los conejos, tanto preinmunes como los obtenidos de las sangrías, fueron diluidos 1/30 y posteriormente se diluyeron de forma seriada 1/3 con la solución de reacción (50 mM Tris/HCl, 0.5 M NaCl, 0.1% gelatina y 0.05% Tween 20) y se incubaron con el veneno durante 1 h a 37°C. Como segundo anticuerpo se utilizó un conjugado anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (Zymed) a una dilución de 1/2000 en la solución de reacción e igualmente se incubaron durante 1 h a 37°C. El desarrollo de color se obtuvo adicionando una solución de pNPP (p-nitrofenilfosfato) de Zymed, y la densidad óptica se determinó en un espectrofotómetro TECAN a una longitud de onda de 405 nm. Los datos obtenidos fueron procesados mediante el programa *GraphPad Prism* (Versión 2; *GraphPad Software*, Inc. San Diego, CA) para determinar el título de anticuerpos, definido como la

dilución a la cual la respuesta fue la mitad de la máxima (EC50).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El principal objetivo de este trabajo fue obtener de forma recombinante y activa la α -latrotoxina de *L. mactans*, ya que es el componente del veneno responsable de la toxicidad en vertebrados. A pesar de que la α LTX consta de 4 dominios: péptido señal, amino, anquirinas y carboxilo terminal, sólo los dominios amino y anquirinas se encuentran presentes en la proteína madura y tóxica. Los primeros intentos en nuestro grupo para expresar la α LTX recombinante se realizaron en células de *E. coli*. Se expresó el dominio amino completo de la α LTX tanto de *L. mactans* como de *L. tredecimguttatus* (Prud'Homme, 2004), sin embargo, estas proteínas nunca pudieron obtenerse de manera soluble a pesar de utilizar diferentes cepas de *E. coli*, condiciones cuidadosamente controladas de incubación y diferentes vectores de expresión. Tampoco se pudo obtener la expresión heteróloga del dominio de anquirinas de la α LTX.

Volynski y colaboradores (1999) reportaron la expresión de la α LTX recombinante completa y activa de *L. tredecimguttatus* utilizando el sistema de células de insecto-baculovirus, por lo que decidimos utilizar este mismo sistema para expresar la α LTX recombinante de *L. mactans*. Para lograr este objetivo partimos de un plásmido obtenido en el laboratorio que tenía insertada la secuencia codificante de la α LTX madura, la cual se subclonó en el vector pMelBacA (Fig. 1). La

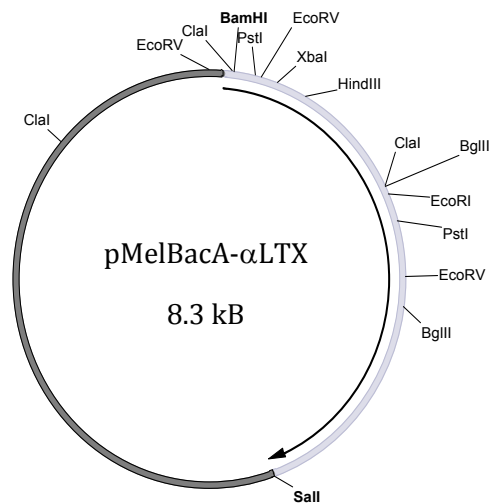


Fig. 1. Esquema del vector pMelBacA que contiene el cADN que codifica para la α LTX madura donde se señalan los principales sitios de restricción. Las enzimas *BamHI* y *SalI* se presentan en negritas y en gris se destaca la región codificante del cADN de la α LTX. La flecha representa el sentido de la traducción del gen.

generación de este vector presentó dificultades poco comunes. Para transformar el producto de la ligación, utilizamos diferentes cepas de *E. coli* como XL1 Blue y TOP 10 y, al analizar el ADN plasmídico de las clonas obtenidas en estas cepas, detectábamos la presencia de recombinaciones. Este fenómeno parece deberse a la presencia de secuencias capaces de formar estructuras secundarias o a que algunos fragmentos del gen de la α LTX constituyen "hot-spots" con alta frecuencia de recombinación. Es de destacar que todas las construcciones donde se insertó el gen de la

α LTX de forma correcta disminuyeron el crecimiento de las colonias bacterianas de origen, fenómeno que podría deberse al tamaño del gen de la α LTX (3.5kb).

El vector pMelBacA- α LTX fue cotransfectado a células de insecto Sf9 junto con ADN de baculovirus y como resultado se obtuvieron 11 placas virales recombinantes que fueron aisladas, amplificadas y tituladas (Fig. 2). Los estudios de expresión de la α LTX recombinante los realizamos con la placa viral 7, ya que mostró el mayor título viral: $6 \cdot 10^8$ ufp/mL.

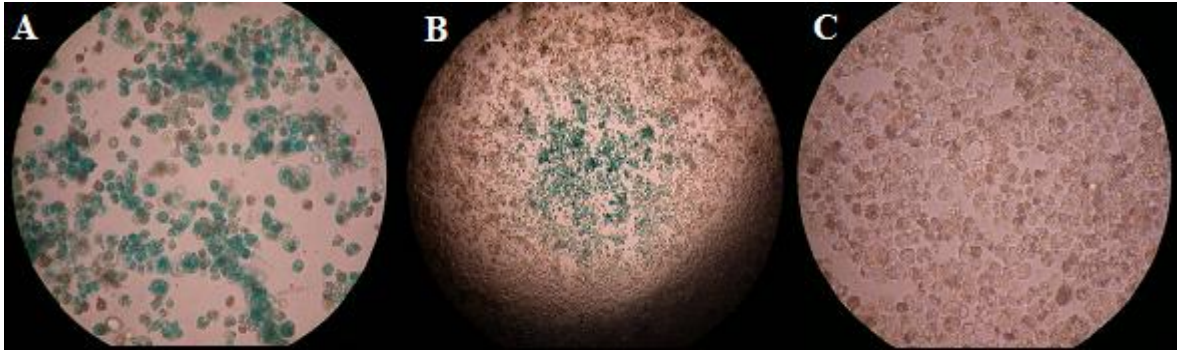


Fig. 2. (A) Células Sf9 infectadas con los baculovirus recombinantes que codifican para la α LTX, observadas con un aumento de 40X. En azul se destaca la hidrólisis del sustrato cromogénico X-gal. (B) Placa viral observada con un aumento de 10X. (C) Células Sf9 no infectadas.

Para purificar la α LTX recombinante, comenzamos con un estudio de su cinética de expresión, para lo cual las células de insecto H5 se sembraron a diferentes densidades celulares y multiplicidades de infección, ya que la infectividad de los virus en un cultivo celular es un evento probabilístico que sigue una distribución de Poisson (Palomares, 1999). Se utilizó la línea celular de insecto H5 porque se ha reportado que expresa concentraciones más altas de proteína recombinante que otras líneas celulares de insecto como Sf9 o Sf21 de uso común (Davis *et al.*, 1993; Rhiel *et al.*, 1997). Para determinar en qué momento se alcanzaba el máximo de concentración de α LTX recombinante, se probaron dos estrategias diferentes en las que se varió el

tiempo de infección y la multiplicidad de infección. Por una parte, se sembraron las células de insecto H5 en medio de cultivo SF900-II a razón de $0.5 \cdot 10^6$ células/mL. Las células fueron infectadas con los baculovirus recombinantes a una MOI de 0.1 ufp/célula. El sobrenadante de cultivo fue recolectado a las 24, 48, 72 y 96 h post-infección y la presencia de α LTX recombinante se determinó mediante SDS-PAGE y *Western Blot*. Bajo estas condiciones el máximo de expresión de la α LTX se alcanzó a las 72 h post-infección (Fig. 3). Como segunda variante, se sembraron las células H5 a una densidad de $1 \cdot 10^6$ células/mL y se infectaron a una MOI de 5 ufp/célula, en este caso el máximo de producción de α LTX se observó a las 48 h post-infección. Este

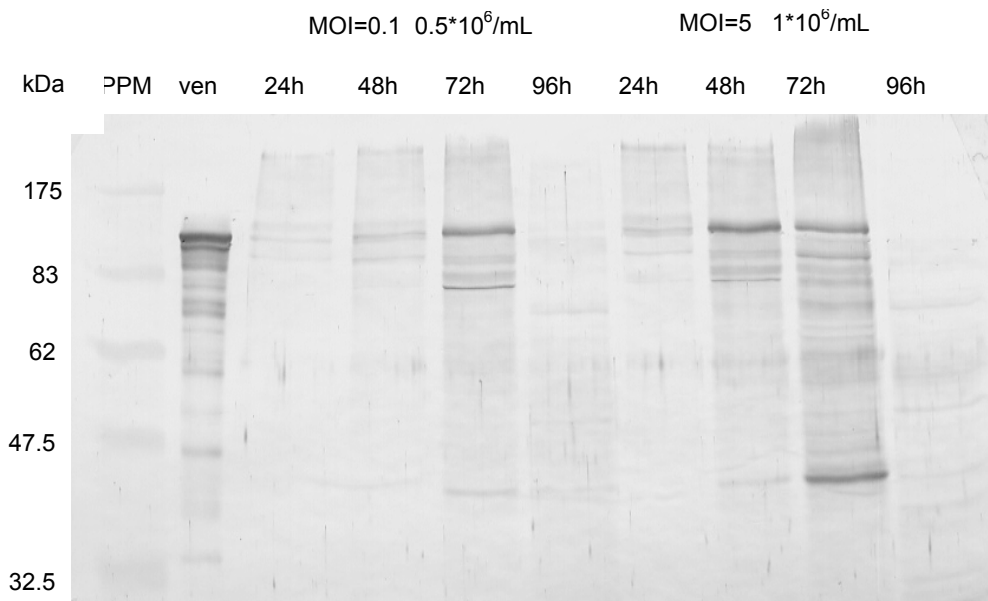


Fig. 3. Expresión de α LTX recombinante medida por ensayos de *Western Blot*. Como primer anticuerpo se utilizó un suero de conejo contra el dominio amino de la α LTX y como segundo anticuerpo se utilizó un conjugado anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina. El substrato fue BCIP-NBT. Como control positivo se utilizó veneno de la araña *L. mactans* (ven). Sobre cada carril se indican los tiempos de recolección y las condiciones de cultivo ensayadas.

resultado se corresponde con otros reportes sobre expresión de proteínas de alto peso molecular, donde se señala que se alcanzan máximos niveles de expresión en etapas tempranas tras la infección viral (Palomares *et al.*, 2002). Como resultado del experimento de cinética de producción de α LTX recombinante, determinamos que, o bien podíamos sembrar las células H5 a una densidad celular de $1 \cdot 10^6$ células/mL e infectarlas con los virus recombinantes a una la MOI de 5 pfu/célula, o sembrarlas a una densidad de $0.5 \cdot 10^6$ células/mL e infectarlas a una MOI de 0.1 pfu/célula. Los sobrenadantes de cultivo obtenidos de esta forma, se colectaron 48 y 72 h postinfección, respectivamente.

El grupo de Volynski (1999), que reportó la expresión de la α LTX de *L. tredecimguttatus*, realizó el cultivo celular y la infección viral en células de insecto crecidas en monocapa y en presencia de STF. Sin embargo, se ha determinado que los cultivos celulares en suspensión facilitan la infección viral debido al incremento de la superficie celular disponible para la entrada de las partículas virales a las células, y que las proteínas presentes en el suero de ternera fetal interfieren con la capacidad infectiva de los virus (Petricevich *et al.*, 2001). Debido a esto, decidimos realizar los cultivos celulares en medio de cultivo sin STF.

Artículos

Como resultado del proceso de purificación obtuvimos 5 fracciones positivas para la α LTX recombinante (1.5 mL/fracción) con una concentración de proteína total que osciló entre los 85 y 110 μ g/mL. El análisis por SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata de estas fracciones mostró la presencia de numerosas

proteínas contaminantes (Fig. 4). Un factor importante que puede influir en el aumento del contenido proteico del sobrenadante de cultivo es la liberación de proteínas de las células de insecto al medio de cultivo, ya que una de las respuestas de las células de insecto

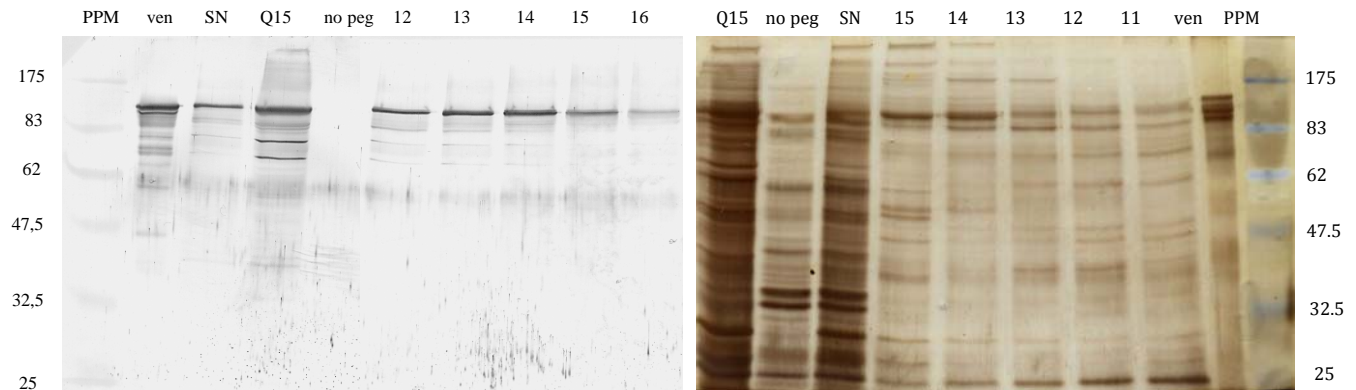


Fig. 4. Purificación de α LTX recombinante. Las fracciones obtenidas luego de la elución de la columna de MonoQ, fueron analizadas por *Western Blot* (gel izquierdo) para detectar la presencia de α LTX. Las fracciones positivas para α LTX (12-16) fueron separadas por SDS-PAGE y las proteínas se visualizaron por tinción con nitrato de plata (gel derecho). También se analizó el sobrenadante de cultivo antes (SN) y después (no peg) de pasarlo por el filtro Q15, así como el eluato del filtro (Q15). Como control positivo de los experimentos se utilizó el veneno de *L. mactans* (ven).

frente a la infección con baculovirus es la liberación de proteasas al citosol (Ikonomou *et al.*, 2003).

Para determinar si las propiedades fisiológicas de la α LTX recombinante se mantenían luego de la purificación, se inyectaron por vía intravenosa a 3 grupos de 3 ratones CD1 cada uno con 20, 30 y 50 μ g de proteína total. A las 48 h, dos de los ratones inyectados con 30 μ g de proteína y todos los

ratones inyectados con 50 μ g de proteína estaban muertos. El ratón que sobrevivió al tercer día del grupo de 30 μ g fue sacrificado debido al estado de hipotermia e inmovilidad en que se encontraba. Como resultado de este experimento, comprobamos que la α LTX recombinante mantuvo sus propiedades biológicas a lo largo del proceso de purificación.

Con el objetivo de estudiar si la inmunización de animales con la α LTX recombinante generaba una respuesta de anticuerpos capaces de reconocer al veneno nativo de *L. mactans*, se inmunizaron dos conejos con el sobrenadante de cultivo de células H5 infectadas con los baculovirus

recombinantes y con la toxina recombinante purificada por FPLC. Como se muestra en la Fig.5, los sueros postinmunes de ambos conejos son capaces de reconocer al veneno de *L. mactans*. Es de destacar que en el conejo donde se alternaron ambos adyuvantes (AIF y alumina), la respuesta inmune fue

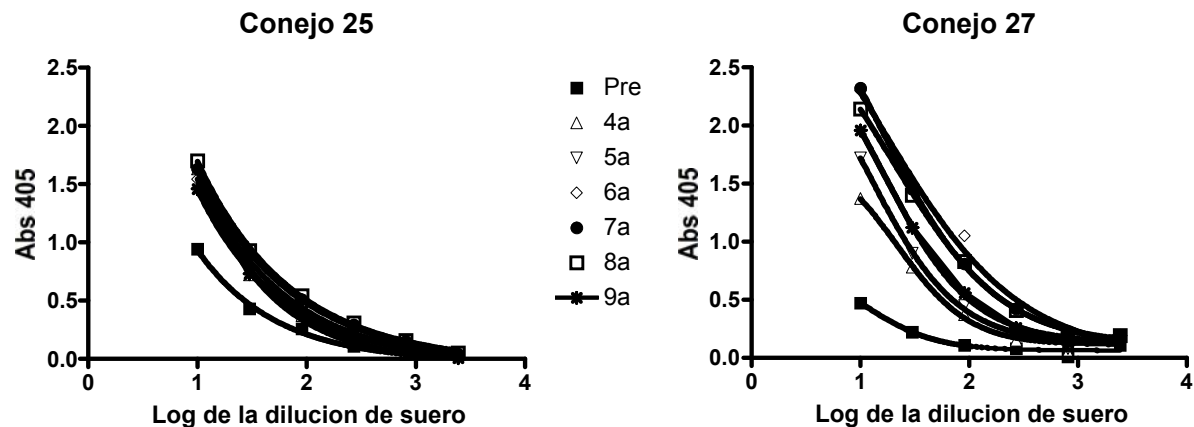


Fig. 5. Reconocimiento del veneno de *L. mactans* por los sueros de los conejos inmunizados con la α LTX recombinante. Dos conejos de la cepa NZW recibieron 12 dosis de 100 μ g del sobrenadante de cultivo de células H5 infectadas con los baculovirus recombinantes y posteriormente fueron inmunizados con α LTX purificada por FPLC (4 inmunizaciones de 350 μ g y 2 inmunizaciones de 60 μ g). La primera dosis se administró acoplada a ACF y las dosis posteriores se administraron con AIF para el conejo 25 y alternando AIF y alúmina para el conejo 27. Los animales fueron sangrados antes del inicio del protocolo y 9 veces durante el transcurso de las inmunizaciones.

mayor a la observada en el conejo donde sólo se utilizó AIF.

El objetivo principal de la expresión de la α LTX recombinante de *L. mactans* es utilizarla como inmunógeno para la generación de anticuerpos neutralizantes contra el veneno nativo de la viuda negra. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este trabajo, podemos concluir que la α LTX recombinante producida utilizando el sistema de células de insecto baculovirus, es capaz de inducir una

respuesta inmune de anticuerpos que, aunque muestra títulos bajos, es específica por el veneno de *L. mactans*. En aras de incrementar los títulos de anticuerpos obtenidos es necesario aumentar el grado de pureza de la proteína recombinante, por lo que nuestros esfuerzos futuros están dirigidos a desarrollar un nuevo protocolo de purificación de la α LTX. Es por esto que una de las alternativas en las que estamos trabajando es agregar una etiqueta de histidinas al dominio amino de la

proteína y obtener de nueva cuenta baculovirus recombinantes que produzcan una proteína que siga siendo igualmente activa a la ya expresada pero más fácil de purificar, y con mejores rendimientos.

AGRADECIMIENTOS: Agradecemos a la Dra. Laura Palomares, a la M.C. Blanca Ramos-Cerrillo y a la M.C. Ruth Pastor Flores por el apoyo brindado.

REFERENCIAS

- Ashton AC, Rahman MA, Volynski KE, Manser C, Orolova EV, Matsushita H, Davletov BA, Van Heel M, Grishin EV & Ushkaryov YA (2000) Tetramerisation of α -latrotoxin by divalent cations is responsible for toxin-induced non-vesicular release and contributes to the Ca^{2+} -dependent vesicular exocytosis from synaptosomes. *Biochimie*, 82:453-468.
- Davis TR, Wickham TJ, McKenna KA, Granados RR, Shuler ML & Wood HA (1993) Comparative recombinant protein production of eight insect cell lines. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 29A:388-90.
- Frontali N, Cecarelli B, Gorio A, Mauro A, Siekevitz P, Tzeng M & Hurlbut W (1976) Purification from black widow spider venom of a protein factor causing the depletion of synaptic vesicles at neuromuscular junctions. *J. Cell. Biol.* 68: 465-479.
- Granata F, Paggi P & Frontali N (1972) Effects of chromatographic fractions of black widow spider venom on in vitro biological systems. *Toxicon*, 10: 551-555.
- Harlow E & Lane D (1988) *Antibodies: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Ikonomou L, Schneider YJ & Agathos SN (2003) Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 62:1-20.
- Knipper M, Madeddu L, Breer H & Meldolesi J (1986) Black widow spider venom-induced release of neurotransmitters: mammalian synaptosomes are stimulated by a unique venom component (α -latrotoxin), insect synaptosomes by multiple components. *Neurosci.* 19: 55-62.
- Lang J, Ushkaryov Y, Grasso A & Wollheim, CB (1998) Ca^{2+} -independent insulin exocytosis induced by alpha-latrotoxin requires latrophilin, a G protein-coupled receptor. *EMBO J.* 17: 648-657.
- Liu J & Mislis S (1998) alpha-Latrotoxin alters spontaneous and depolarization-evoked quantal release from rat adrenal chromaffin cells: evidence for multiple modes of action. *J. Neurosci.* 18: 6113-6125.
- Palomares LA (1999) Estudio del proceso de producción y ensamblaje de proteínas multiméricas a través del sistema células de insecto-baculovirus. Tesis de Dr. en Ciencias, UNAM.
- Palomares LA, Lopez S & Ramirez OT(2002) Strategies for manipulating the relative concentration of recombinant rotavirus structural proteins during simultaneous production by insect cells. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 635-44.

Artículos

- Petrichevich VL, Palomares LA, Gonzalez M & Ramirez OT (2001) Parameters that determine virus adsorption kinetics: toward the design of better infection strategies for the insect cell-baculovirus expression system. *Enzyme Microb. Technol.* 29: 52-61.
- Platnick NI (1993) Advances in spider taxonomy 1998-1991: with synonymies and transfers 1940-1980. New York Entomological Society, New York.
- Platnick NI (1997) Advances in spider taxonomy 1992-1995: with redescription 1940-1980. New York Entomological Society, New York, pp. 1-976.
- Prud'Homme MA (2004) Producción y evaluación de antígenos recombinantes de la α -latrotoxina de *Latrodectus mactans*. Tesis de Maestría, IBT, UNAM.
- Rhiel M, Mitchell-Logean CM & Murhammer DW (1997) Comparison of *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (High Five) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. John Wiley & Sons Inc.
- Rosenthal L & Meldolesi J (1989) α -Latrotoxin and related toxins. *Pharmac. Ther.* 42: 115-134.
- Volynski KE, Nosyreva ED, Ushkaryov YA & Grishin EV (1999) Functional expression of α -latrotoxin in baculovirus system. *FEBS Letters*, 442: 25-28.