



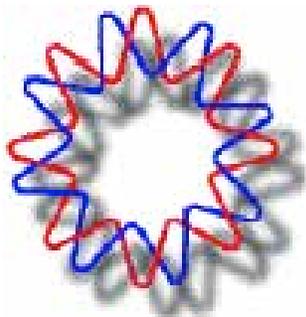
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EXPRESIÓN DE α -LATROTOXINA
RECOMBINANTE ACTIVA DE *Latrodectus mactans*
UTILIZANDO EL SISTEMA DE CÉLULAS DE
INSECTO-BACULOVIRUS

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A:
MABEL RODRÍGUEZ GONZÁLEZ



CUERNAVACA, MORELOS, 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

La presente tesis se realizó bajo la dirección del Dr. Roberto Stock Silberman, en el Departamento de Medicina Molecular y Bioprocesos del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), en Cuernavaca, Morelos. Durante mis estudios fui becaria de la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) de la UNAM y recibí el apoyo de Laboratorios Silanes a través de convenios de investigación suscritos con nuestro laboratorio.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Roberto Stock. Gracias por todo el conocimiento transmitido, por tu paciencia y tu APOYO, y por tener siempre tiempo para mí. Estoy muy orgullosa de ser tu estudiante.

Al Dr. Alejandro Alagón. Gracias a usted pude venir a este país, del que ya formo parte, orgullosamente. Gracias por toda su ayuda incondicional y por supuesto, gracias por ser un ejemplo.

A la Dra. Laura Palomares y al Dr. Baltazar Becerril, muchas gracias por las propuestas, ideas, discusiones y críticas en cada tutorial. Gracias Laura por todo el apoyo con la tecnología de los baculovirus recombinantes.

A los miembros del Jurado:

Dr. Alejandro Alagón

Dr. Enrique Rudiño

Dr. Gerardo Corzo

Dr. Jorge Paniagua

Dr. Roberto Stock.

Muchas gracias por tomarse el tiempo de revisar este trabajo, por las correcciones y los comentarios.

A la M en C. Blanca Ramos. Muchas gracias por compartir tus pipetas conmigo y por estar codo con codo, día a día a mi lado, ayudándome en todo lo humanamente posible.

A la Dra. Rosana Sánchez. Muchas gracias por toda tu ayuda material y los consejos oportunos que hicieron posible el avance del proyecto.

A todos los integrantes del grupo del Dr. Alagón que me ayudaron a lo largo de estos tres años. Gracias por los reactivos, equipos, materiales, pero sobretodo gracias por las enseñanzas.

Al M en C. Alejandro Olvera, gracias por toda la ayuda en el cuarto de cultivo.

Quiero agradecer especialmente a Angélica Linares, Olegaria Benítez y Ricardo Mondragón. Sin su trabajo este laboratorio no existiría.

Muchas gracias a todos los muchachos del grupo del Dr. Tonatiuth que me ayudaron en el transcurso de esta tesis. Gracias Jimmy, Ruth, Germán, Lilí y Mauricio por la ayuda con los medios de cultivo, células, técnicas y equipos. Gracias a la M en C. Ruth Pastor por el apoyo con el cultivo de las células de insecto.

A la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología de la UNAM, gracias Jorge y Soledad por su eficiencia y por aceptar mis secuencias fuera de horario.

Al Bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en especial a la Dra. Elizabeth Mata. Gracias por el apoyo con los animales.

A la Unidad de Docencia del Instituto de Biotecnología de la UNAM, en especial a Maribel y Gloria, gracias por su paciencia y su ayuda.

A todos los que fueron mis profesores durante los cursos y tópicos de la Maestría en Ciencias Bioquímicas del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

INDICE

ABREVIATURAS

RESUMEN

I. Introducción

II. Objetivos

III. Materiales y Métodos

IV. Resultados

V. Discusión

VI. Conclusiones

VII. Perspectivas

VIII. Referencias Bibliográficas

APENDICE DE SOLUCIONES

ABREVIATURAS

°C	grados Celsius
µg	microgramos
µL	microlitros
αLCT	α-latrocrustatoxina
δLIT	δ-latroinsectotoxina
αLIT	α-latroinsectotoxina
αLTX	α-latrotoxina
ACF	adyuvante completo de Freund
ADNc	ácido desoxirribonucleico codificante
AIF	adyuvante incompleto de Freund
BCA	ácido bicinconínico
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato
BSA	albúmina de suero bovina
cm	centímetros
DL ₁₀₀	dosis letal
EDTA	ácido etilendiamino tetra-acético
FPLC	<i>fast protein liquid chromatography</i>
g	gramos
h	horas
kb	kilobases
kDa	kilodaltons
L	litros
M	molar
mA	miliamperes
mg	miligramos
min	minutos
mL	mililitros
mM	milimolar
MOI	multiplicidad de infección
NaCl	cloruro de sodio
NBT	azul de tetrazolio
ng	nanogramos
nm	nanómetros
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
pfu	unidades formadoras de placas
rpm	revoluciones por minuto
SDS-PAGE	<i>sodium dodecil sulphate-polyacrialmide gel electrophoresis</i>
SN	sobrenadante
STF	Suero de ternera fetal
TAE	Tris acetato EDTA
TBST	<i>Tris buffer saline Tween 20</i>
V	voltios
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

RESUMEN

La araña conocida como viuda negra o araña capulina pertenece al género *Latrodectus*, dentro del cual se han descrito 40 especies. Entre ellas se encuentra la araña *L. mactans* distribuida en todo México. El veneno de la viuda negra consta de varios componentes, dentro de los que se encuentra una proteína de 130kDa denominada α -latrotoxina (α LTX), responsable del envenenamiento en los vertebrados mordidos por esta araña. El tratamiento más efectivo contra la mordedura de la viuda negra es la administración de antiveneno. En México desde el año 1999 el Instituto Bioclón 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*. El proceso de obtención del veneno es muy riesgoso y poco eficiente. En nuestro laboratorio se clonó y secuenció el gen de la α -latrotoxina de *L. mactans* (Prud'homme, 2004). La comparación de su secuencia nucleotídica y de aminoácidos con las secuencias reportadas para la α LTX de *L. tredecimguttatus*, demostró que ambas toxinas son idénticas en un 93%. A partir de estos resultados nos propusimos expresar de manera recombinante la α LTX de *L. mactans* y utilizarla como un inmunógeno sustituto del veneno en la producción del antiveneno Aracmyn®. Para expresar la α LTX de forma recombinante utilizamos el sistema de células de insecto-baculovirus, para lo cual subclonamos el cADN de la α LTX en el vector de transferencia baculoviral pMelBacA. Esta construcción fue cotransfectada a células de insecto Sf9 junto con ADN de baculovirus (*Bac and Blue System*, Invitrogen), obteniéndose baculovirus recombinantes que tienen insertado en su genoma la secuencia del cADN de la α LTX mediante un proceso de recombinación genética. Al infectar células de insecto Hi5 con los virus recombinantes, logramos expresar la α LTX, la cual se purificó parcialmente mediante cromatografía de intercambio aniónico en un sistema de FPLC. Al inmunizar conejos con la α LTX recombinante, se desarrolló una respuesta de anticuerpos capaces de reconocer al veneno nativo de *L. mactans*. Nuestros esfuerzos futuros están dirigidos hacia la optimización del proceso de purificación de la α LTX recombinante para aumentar el grado de pureza del producto final.

I. Introducción

I.1 Generalidades

El phylum Arthropoda (del griego *arthron*: articulación y *podas*: pie) es el grupo más extenso del reino animal, compuesto por más de un millón de especies descritas (Giribert y Ribera, 1998). Los artrópodos son animales con patas articuladas y exoesqueleto rígido, que comprende a las arañas, escorpiones, ácaros, garrapatas, crustáceos, milpiés, ciempiés, entre otros (Hickman, 1991). Este phylum se dividen en dos subphyla: el phylum Mandibulata, al cual pertenecen los artrópodos antenados y cuyos primeros apéndices son mandíbulas: insectos, crustáceos, milpiés y ciempiés, y el phylum Chelicerata, el cual está compuesto por aquellos artrópodos cuyos primeros apéndices son quelíceros: arácnidos, escorpiones, garrapatas y ácaros (Barnes, 1989).

Los arácnidos son un grupo muy antiguo y actualmente se estima que existen alrededor de 400,000 especies en el mundo (Rash y Hodgson, 2002), sin embargo, el número de especies de arañas descritas es de aproximadamente 50,000 (Rosenthal y Meldolesi, 1989). En México se han encontrado 50 familias, 340 géneros y alrededor de 2,000 especies (Hoffmann, 1993). Lo más probable, sin embargo, es que estas cifras estén muy por debajo de la realidad ya que falta mucho por coleccionar y conocer. Las arañas son animales nocturnos y depredadores que se alimentan principalmente de insectos, aunque algunas de sus presas también son pequeños roedores y reptiles.

I.2 Morfología

El cuerpo de la araña se divide en dos: la parte anterior, denominada prosoma o cefalotórax, y la parte posterior u opistosoma o abdomen, las cuales están unidas por un tallo estrecho llamado pedicelo (Fig.1). La función principal del cefalotórax es la locomoción, existe además un canal digestivo y sistemas de integración nerviosa. Normalmente está cubierto por un caparazón duro y no segmentado. En esta parte del cuerpo se encuentran las glándulas venenosas, además de un número variable de pares de ojos, un par de quelíceros que alojan a los colmillos, un par de pedipalpos (que en los machos son los órganos copuladores) y cuatro pares de patas. En el abdomen se llevan a cabo funciones vegetativas

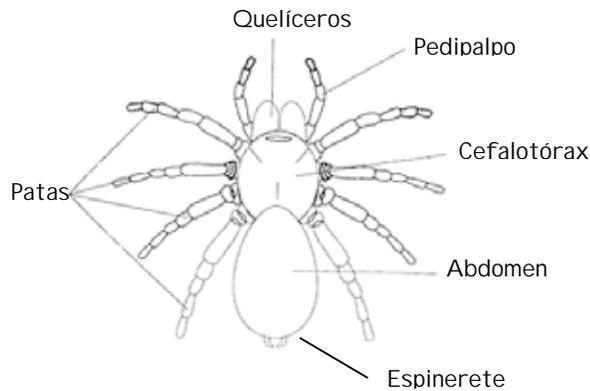


Fig. 1. Morfología de una araña

como digestión, circulación, respiración, excreción y reproducción. Aquí se encuentran también los espineretes, que son los apéndices por donde se secreta la seda (Tu, 1984).

Las arañas inyectan veneno a sus presas y las inmovilizan. Si bien no todas las arañas utilizan telas para cazar, todas (o casi todas) tienen la capacidad de producir seda. Las arañas tienen digestión externa ya que carecen

de un aparato de masticación eficiente: regurgitan fluidos digestivos sobre la presa o dentro de ésta y luego sorben el líquido.

Todas las arañas son venenosas y el veneno se produce en las glándulas especializadas ubicadas en el prosoma en la base de los quelíceros. El veneno es utilizado por las arañas para paralizar a su presa y como medio de defensa contra algunos depredadores. Las glándulas venenosas están compuestas por un epitelio de secreción holócrina cubierto por una capa de musculatura que descansa sobre una membrana basal. El veneno se secreta cuando hay una contracción de la musculatura pasando por un par de ductos a través de los quelíceros y sale por el extremo de cada uno del par de colmillos (Pineda, 2002; Rash y Hodgson, 2002).

1.3 *Latrodectus mactans*

La araña conocida como viuda negra o araña capulina pertenece al género *Latrodectus* (Theridiidae: Arthropoda, Arachnida, Araneae) (Platnik, 1993 y 1997) y se distribuye a través de todo el mundo. Existen dentro de este género 40 especies descritas, dentro de las cuales se encuentran: *L. mactans*, *L. tredecimguttatus*, *L. lugubris*, *L. geometricus*, *L. hesperus* y *L. hasselti*, entre otras. *L. mactans* se distribuye en todo México, tanto en regiones secas como húmedas, en las zonas frías, templadas y cálidas, siendo más abundante en estas últimas.



Fig. 2. *Latrodectus mactans* hembra con ooteca (Foto A. Alagón)

La viuda negra hembra mide aproximadamente 1.5 cm de longitud (Fig. 2), es de color negro brillante y tiene una marca roja en forma de reloj de arena en la parte ventral de su abdomen en forma de capulín. Los machos miden la mitad que las hembras, son de color café y normalmente tienen bandas o puntos amarillos o rojos en la parte dorsal del abdomen, también tienen una marca en forma de reloj de arena pero de color pálido y son incapaces de envenenar a un humano. La viuda negra hembra es la responsable de los accidentes de mordedura y envenenamiento, y ataca cuando se siente amenazada o cuando cuida su ooteca.

Las viudas negras tejen una telaraña muy resistente, dura y muy pegajosa que se seca en contacto con el aire. Viven en lugares oscuros cerca del piso, normalmente donde hay basura, pilas de madera, piedras, o en las paredes de las casas. Son cazadoras de espera y, al caer una presa en la tela, la inmovilizan con la seda y luego la muerden para inyectarle veneno. La hembra, después de copular con el macho, puede comérselo si éste no escapa a tiempo (este comportamiento es normal en muchas arañas). Así mismo, es capaz de guardar el esperma, y cuando las condiciones nutricionales son apropiadas, pone un saco redondo blanquecino que contiene de 25 a 900 huevos (ooteca) que tardan de 14 a 30 días en madurar. Pocas arañas sin embargo logran sobrevivir debido al canibalismo entre las crías (Gertsch, 1949). Las arañas nacen en estado de ninfas con aspecto de adultos y mudan de piel varias veces al año aumentando de tamaño hasta alcanzar su madurez sexual, pudiendo llegar a vivir hasta dos años (Alvarez del Toro, 1992).

El síndrome causado por la mordedura de la *L. mactans* hembra se conoce como latroductismo, y se caracteriza por un dolor en la zona de la mordedura que luego se hace más intenso y se extiende hacia los músculos abdominales y lumbares. Además puede causar vómitos, náuseas, lipotimias, dificultad para respirar y en muy pocos casos (menos del 1%), la muerte, siendo más afectados los niños y los ancianos.

I.3.1 Veneno de *L. mactans*

Los venenos de las arañas, así como los de serpientes y escorpiones, son mezclas heterogéneas de sustancias biológicamente activas e inactivas. Los constituyentes mayoritarios son proteínas, polipéptidos, poliaminas, enzimas, nucleótidos, aminoácidos libres y sales inorgánicas. Los primeros tres son especie-específicos. El veneno de la viuda

negra es 15 veces más tóxico (por peso) que el veneno de una víbora de cascabel, y solamente se inyecta una pequeña cantidad debido a que los quelíceros son muy pequeños, por lo que los efectos no son tan severos. La severidad de la reacción depende de la edad del individuo mordido, su estado de salud y la cantidad de veneno inyectado. Este veneno se produce por secreción holócrina: las células secretorias que se encuentran en el lumen de la glándula venenosa se desintegran y vierten sus contenidos en el lumen. Como resultado, la toxinas aparecen en el lumen junto con varios organelos, proteasas y pequeñas moléculas (Rash y Hodgson, 2002).

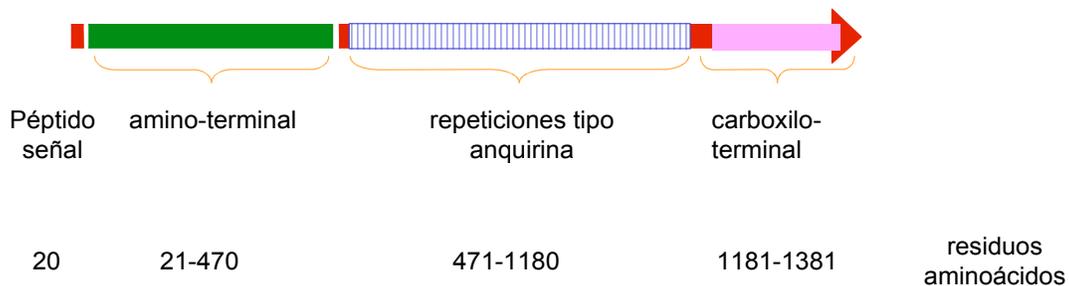
La caracterización del veneno de *L. mactans* demostró la presencia de varias proteínas selectivamente tóxicas para los vertebrados, insectos o crustáceos: α -latrotoxina, α -latroinsectotoxina y α -latrocrustatoxina, respectivamente (Granata et al., 1972; Frontali et al., 1976; Knipper et al., 1986). Todas las latrotoxinas estudiadas son proteínas acídicas con puntos isoeléctricos entre 5 y 6, y masas moleculares entre 110 y 130 kDa. También se ha identificado una proteína de bajo peso molecular que co-purifica junto a la α -latrotoxina, llamada latroductina (Kiyatkin et al., 1992; Pescatori et al., 1995), la cual estabiliza a la α -latrotoxina pero no tiene actividad biológica conocida (Volkova et al., 1995) y tampoco se requiere para que la α -latrotoxina ejerza su efecto (Volynski et al., 1999).

Hasta la fecha se han clonado y secuenciado cuatro latrotoxinas, todas de la especie *L. tredecimguttatus*: α LTX, α LIT, δ LIT y α LCT (Kiyatkin et al., 1990, 1993; Dulubova et al., 1996; Volynski et al., 1999b; Danilevich y Grishin, 2000), y la masa molecular que se deduce a partir de sus secuencias de cADN es mucho mayor que la determinada experimentalmente mediante electroforesis en SDS-PAGE (Grasso, 1976; Krasnoperov et al., 1990 a,b). Estos resultados indicaron que las latrotoxinas se sintetizan como pro-toxinas largas que luego sufren un procesamiento post-traduccion. Los dominios N- y C-terminal de estas toxinas están flanqueados por secuencias hidrofílicas cortas que terminan en un grupo de aminoácidos básicos, los cuales son similares al sitio de reconocimiento de la furina, una enzima proteolítica involucrada en el procesamiento de muchos precursores proteicos. Debido a esto se propuso que las latrotoxinas son maduradas (activadas) por la acción de una proteasa de tipo furina en el lumen glandular (Volynski et al., 1999b). La secreción holócrina del veneno se corrobora por la presencia en todas las

latrotoxinas de las repeticiones de anquirina, las cuales se hallan solamente en proteínas intracelulares (Sedgwick y Smerdon, 1999). Estas repeticiones de aminoácidos son similares a las presentes en la proteína de citoesqueleto denominada anquirina, y se piensa que median las interacciones intra e intermoleculares entre las proteínas así como su oligomerización (Sedgwick y Smerdon, 1999; Andrade et al., 2001).

1.4 α -Latrotoxina

La α -latrotoxina es la que afecta a los vertebrados y está compuesta por una sola cadena polipeptídica no glicosilada de 130kDa, pudiendo existir tanto en forma monomérica como dimérica (Ashton et al., 2000). En su forma activa se encuentra como tetrámero, para lo cual se necesita la presencia de cationes divalentes como Ca^{2+} ó Mg^{2+} (Krasilnikov y Sabirov, 1992; Ashton et al., 2001). La α -latrotoxina está compuesta de 4 dominios: (1) péptido señal, que abarca los primeros 20 aminoácidos y es eliminado en la toxina madura (2) dominio amino, abarca del aminoácido 21 hasta el residuo 470 y contiene 3 residuos invariantes de cisteína (3) dominio intermedio o de anquirina, comprende de los aminoácidos 471 hasta el residuo 1180; tiene 13 secuencias repetidas de 33 aminoácidos y (4) dominio carboxilo, que va desde el aminoácido 1181 al 1381, el cual es el menos conservado entre las latrotoxinas y se elimina durante la maduración de las mismas (Grishin, 1996).



En estudios de criomicroscopía se ha observado que los monómeros de la toxina tienen tres dominios diferentes denominados “ala” (corresponde al dominio amino, residuos 20-320 aproximadamente), “cuerpo” (corresponde a la primera parte del dominio intermedio, aproximadamente del 321 al 1015), y “cabeza” (que corresponde a la segunda parte del dominio de anquirinas, residuos 1015-1179, Fig. 3). Los monómeros se ensamblan en dímeros asimétricos en los que las alas quedan perpendiculares y los dímeros se unen para

formar tetrámeros. Estos tetrámeros se asemejan a una propela de 250 Å de diámetro y 100 Å de grosor (Fig. 4) (Orlova et al., 2000) y tienen una base hidrofóbica de unión a la membrana, la cual forma un canal de 25 Å de diámetro que la atraviesa y permite el paso de cationes divalentes y algunos monovalentes (Robello et al., 1987; Wanke et al., 1986; Hurlbut et al., 1994), así como de prácticamente todos los neurotransmisores estudiados: GABA, acetilcolina, norepinefrina, glutamato, otras catecolaminas y péptidos (Tzeng et al., 1978; Baba y Cooper., 1980; Rosenthal y Meldolesi, 1989).

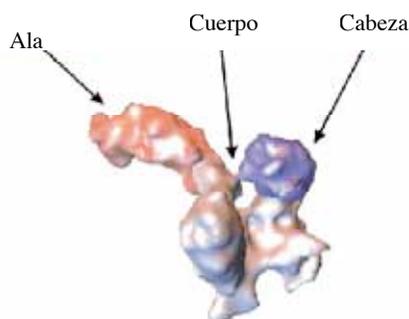


Fig.3. Estructura de los dominios de la α LTX (Orlova, et al., 2000)

La α -latrotoxina no tiene actividad enzimática (Grasso, 1988), sin embargo produce una completa liberación de neurotransmisores al unirse a las terminales neuronales de los vertebrados, lo que conlleva a la parálisis muscular y en algunos casos a la muerte por asfixia cuando el diafragma es afectado (Rosenthal y Meldolesi, 1989; Liu y Misler, 1998; Lang et al., 1998). La α -latrotoxina ejerce su efecto de dos formas: puede insertarse en la membrana y formar un canal iónico no selectivo provocando despolarización (Finkelstein et al., 1976; Rosenthal et al., 1990; Hurlbut et al., 1994) o puede unirse a receptores sinápticos específicos (Lelianova et al., 1997), desencadenando en ambos casos la liberación de los neurotransmisores. La asociación de la α -latrotoxina con sus receptores específicos contribuye a su inserción en la membrana plasmática (Volynski et al., 2000), y en ausencia de los mismos sólo se inserta cuando se encuentra a concentraciones de dos órdenes de magnitud mayores a la normal.

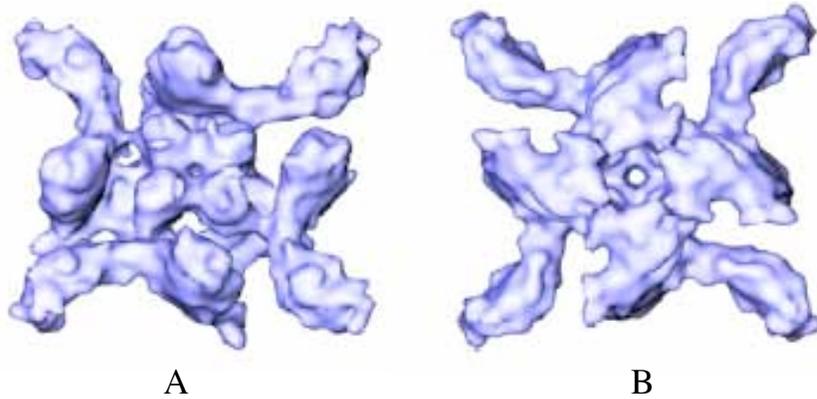


Fig.4. A. Vista superior de la α -latrotoxina en su forma tetramérica. B. Vista desde el lado de unión a la membrana (Orlova et al., 2000).

Existen dos receptores caracterizados para la α LTX en la membrana presináptica, uno dependiente y otro independiente de Ca^{2+} (neurexina y latrofilina, respectivamente) (Lelianova et al., 1997). En estudios *in vitro* se demostró que en células en las que la α -latrotoxina formó poros al interactuar con la neurexina en presencia de Ca^{2+} , la eliminación de este catión provocó la disociación del complejo α -latrotoxina-receptor, pero la toxina permaneció unida a la membrana y continuó formando poros (Volynski et al., 2000). A partir de este estudio, se concluyó que la α -latrotoxina por sí sola puede formar poros en la membrana, y que ni los receptores específicos ni otras proteínas de membrana contribuyen físicamente a este proceso. Se sugirió entonces que cualquier proteína de superficie que facilite la inserción de la toxina en la membrana actúa probablemente incrementando la concentración de la α -latrotoxina en la superficie celular y/o orientando de manera adecuada el tetrámero para la formación del poro (Volynski et al., 2000; Hlubek et al., 2000; Van Renterghem et al., 2000).

Todas las latrotoxinas conocidas han sido utilizadas en el estudio de los mecanismos involucrados en la regulación de la liberación de neurotransmisores, y sin dudas la α -latrotoxina ha sido la más utilizada. El estudio del mecanismo de acción de esta toxina ha ayudado a: confirmar la hipótesis vesicular de liberación de transmisores (Ceccarelli y Hurlbut, 1980; Hurlbut et al., 1990), establecer la necesidad de Ca^{2+} para la endocitosis (Ceccarelli y Hurlbut, 1980), caracterizar la liberación individual de transmisores en el

sistema nervioso central (Auger y Marty, 1997) e identificar dos familias importantes de receptores superficiales de células neuronales (Ushkaryov et al., 1992; Lelianova et al., 1997; Krasnoperov et al., 1997). Recientemente, el diseño de una α -latrotoxina mutada (α LTX^{N4C}) ha permitido profundizar en el estudio de la cascada intracelular de señales que desencadena la toxina nativa (Ashton et al., 2001; Capogna et al., 2003; Volynski et al., 2003). Debido a que la toxina mutante es incapaz de formar poros y sólo actúa mediante unión a receptores, ha permitido estudiar las propiedades de los depósitos intracelulares de Ca²⁺ implicados en la vía de transducción de señales (Capogna et al., 2003).

1.5 Antivenenos

El desarrollo de los antivenenos comenzó en el año 1887, cuando Henry Sewall demostró que las palomas podían volverse inmunes al veneno de la serpiente de cascabel *Sistrurus catenatus* cuando se les administraban dosis crecientes de veneno (Sewall, 1887). En el año 1895, Phisalix y Bertrand utilizaron veneno de víbora tratado con calor para inmunizar diferentes animales (Phisalix y Bertrand, 1895) y más tarde, Albert Calmette demostró que el suero de conejos inmunizados con el veneno de cobra, al ser inoculado vía intravenosa a conejos sanos, los protegía contra los efectos del veneno (Calmette, 1895). Calmette además fue el primero en tratar a un humano envenenado por una cobra con un suero de caballo inmunizado con el veneno de este animal. El primer antiveneno comercial equino fue producido por Calmette en el año 1898, y en el año 1911, Vital Brasil comenzó la producción de antiveneno a gran escala (Lalloo y Theakston, 2003). Posteriormente, otros países como Estados Unidos, Australia y Japón comenzaron a producir antivenenos (Russell, 1988; Sutherland, 1994).

La mayoría de los antivenenos se producen siguiendo el protocolo desarrollado por Calmette (Calmette, 1895). Los animales, generalmente caballos, se inmunizan con dosis crecientes de veneno durante varios meses para incrementar el porcentaje de anticuerpos neutralizantes sin afectar al animal en cuestión. El uso de diferentes adyuvantes como la alúmina, ha permitido disminuir el riesgo de los animales productores de suero ya que proporcionan una lenta liberación del veneno.

Los primeros antivenenos consistieron en suero equino puro hasta el año 1930, cuando se utilizó la precipitación del suero con sulfato de amonio para separar las inmunoglobulinas

IgG (Pope, 1939). Posteriormente, las IgG fueron digeridas con pepsina o papaína para la obtención de los fragmentos $(Fab')_2$ o Fab, respectivamente. Recientemente se ha utilizado la precipitación con ácido caprílico para separar las proteínas no IgG del suero hiperinmune. En la actualidad, las compañías productoras de antiveneno utilizan una o varias de estas técnicas en conjunto para incrementar la calidad del producto final.

Los animales más utilizados para producir antivenenos son los caballos, debido a que son muy dóciles, se les puede extraer grandes volúmenes de sangre y presentan una gran cantidad de inmunoglobulinas circulantes en la sangre. Un caballo puede durar 10 años como animal productor de anticuerpos neutralizantes, siempre que reciba el trato adecuado. A estos animales se les pueden extraer entre 5 y 10 litros de sangre desde 1 hasta 6 veces al año. Sin embargo, existen desventajas pues algunas personas son sensibles a proteínas equinas por lo que pueden desarrollar enfermedad del suero. Además, los caballos necesitan un cuidado especializado.

A principios de la década de 1980 comenzaron a utilizarse ovejas, las cuales son mucho más baratas y son fáciles de criar en países de alta incidencia de mordedura de serpientes (Smith et al., 1992). No obstante, el creciente desarrollo de la encefalitis espongiiforme en estos animales se ha limitado su utilización como productores de antiveneno. Otros animales han sido utilizados para la producción de antivenenos como carneros, conejos y llamas. Recientemente se han desarrollado antivenenos del tipo IgY, purificados a partir de la yema del huevo de gallinas. Una de las ventajas de las IgY es que no fijan complemento, eliminando así uno de los principales factores desencadenantes de la enfermedad del suero (Thalley et al., 1990; Carroll et al., 1992).

I.5.1 Antivenenos en México

En los años treinta del siglo XX, los doctores Carlos León de la Peña e Isauro Venzor Fuedesi produjeron el primer suero equino antialacrán utilizado en México (Chavez Haro, 2007). Para ello utilizaron como referencia al Instituto Butantan de Brasil y obtuvieron información del suero fabricado en Egipto. El suero obtenido se envió al Instituto de Higiene en la Ciudad de México, donde se autorizó su uso en humanos en el año 1927. De 1929 a 1934, el tratamiento fue aplicado a 1677 pacientes, de los cuales sólo 38 fallecieron en el año 1929 y entre los años 1932 y 1934 sólo murieron 9 personas. Hacia la década de los cuarenta, la tecnología de los sueros antialacrán la adquirió Laboratorios Martínez y

Nájera, pero en los sesenta pasó a poder de los laboratorios Zapata. Un tiempo más tarde fue adquirida por Profarma y luego llegó a manos del Instituto Bioclón. A principios de los noventa el suero se convirtió en faboterápico, tecnología patentada en México, Australia y los Estados Unidos (Chávez Haro, 2007). Actualmente el uso de faboterápicos ha eliminado casi por completo las reacciones de hipersensibilidad de tipo inmediato (anafilaxia) y de tipo tardío (enfermedad del suero). En más de 250 mil pacientes tratados anualmente en el IMSS con los faboterápicos (Alacramyn® y Antivipmyn®) no ha habido una sola reacción aguda o grave (Maraboto-Mártínez et al., 1997).

En la actualidad, la producción de antivenenos a nivel mundial ha disminuido debido al bajo valor comercial de esta tarea. Es por esto que la producción de antivenenos ha estado guiada hacia la disminución de los costos de producción y no por incrementar la calidad del producto final, por lo que nos encontramos en un momento de crisis del suministro de antivenenos en muchos países. Podemos citar el ejemplo de África subsahariana, donde se suministra principalmente el antiveneno contra mordedura de serpiente producido por el Instituto Pasteur de Francia, en cantidades insuficientes y a precios muy elevados (Lalloo y Theakston, 2003). Nuestro país cuenta con la mayor experiencia clínica en el manejo con anticuerpos de pacientes envenenados, en particular por alacrán. México dispone de antivenenos de gran calidad contra vipéridos (cascabeles, nauyacac y cantiles), coralillos, la araña viuda negra y los alacranes, por lo que la mortalidad por mordedura o piquete de estos animales es baja y continúa decreciendo. Nuestro país cuenta con el único antiveneno del mundo producido a partir de la inmunización de caballos con una proteína recombinante, la esfingomielinasa D del veneno de la araña *Loxosceles* (Loxmy®), el cual se encuentra actualmente en fase de estudios experimentales clínicos.

I.5.2 Aracmyn®

Para el tratamiento de pacientes mordidos por la araña *Latrodectus* se han utilizado diversos fármacos, entre ellos el gluconato de calcio, antiespasmódicos y relajantes musculares. En algunos lugares del mundo incluso, se hacía un torniquete por encima de la mordida y se chupaba el veneno. No obstante, el tratamiento más efectivo es la administración de antiveneno. En México desde el año 1999 el Instituto Bioclón 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 cada inmunización se necesita el veneno de un número creciente de arañas, el cual se obtiene mediante estimulación eléctrica. Este proceso es muy laborioso, y debe cuidarse de no contaminar el veneno con los fluidos digestivos de la araña, los cuales pueden degradarlo.

1.6 Antecedentes

En nuestro laboratorio se clonó y secuenció el gen de la α -latrotoxina de *L. mactans* (Prud'Homme, 2004), y la comparación de su secuencia nucleotídica y de aminoácidos con las secuencias reportadas para *L. tredecimguttatus*, demostró que ambas toxinas son idénticas en un 93%, y que la mayoría de los cambios observados son conservativos. Además, el dominio amino-terminal completo (P₂₁₋₄₅₃) así como un fragmento de este dominio (P₂₄₇₋₄₅₃) de la α -latrotoxina de *L. mactans*, fueron expresados en células de *E. coli*, y su producción a gran escala en un bioreactor con capacidad de 5L permitió la obtención de 28mg de proteína 90% pura. Los antígenos expresados en *E. coli* a partir de la clonación del gen de la α -latrotoxina de *L. mactans* se obtuvieron de forma insoluble como cuerpos de inclusión. En estudios *in vivo*, si bien estas proteínas fueron efectivas como inmunógenos, los anticuerpos generados sólo fueron capaces de neutralizar a la toxina nativa cuando se utilizó alúmina como adyuvante (Prud'Homme, 2004).

La clonación y secuenciación del gen de la α -latrotoxina de *Latrodectus tredecimguttatus* fue descrita por el grupo de E. Grishin en Moscú (Kiyatkin, et al., 1990). En 1999, tras nueve años de trabajo, este grupo reportó por primera vez la expresión de la α -latrotoxina recombinante utilizando un sistema de células de insecto transfectadas con un baculovirus (Volynski et al., 1999). Esta toxina resultó ser idéntica a la toxina nativa en cuanto a su toxicidad en ratones y unión a sus receptores correspondientes: latrofilina y neurexina-1 α . Sin embargo, luego del proceso de purificación, la α -latrotoxina recombinante se obtuvo con una pureza final del 40-60%.

II. Objetivos

El proceso de producción del antiveneno Aracmyn[®], actualmente, depende completamente del veneno de la araña *L. mactans*. La obtención del mismo es una actividad onerosa y conlleva riesgos que comprometen tanto la calidad del veneno como la salud del trabajador. Luego de analizar detalladamente todos estos antecedentes, nos propusimos como principal objetivo de nuestro trabajo obtener la α -latrotoxina recombinante madura y activa (dominios amino y anquirina) para utilizarla como sustituto del veneno de *L. mactans* 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.

II.1 Objetivos particulares:

1. Clonar el cADN codificante para los dominios amino-anquirina de la α LTX en el vector de transferencia baculoviral pMelbacA.
2. Mediante el proceso de cotransfección de células de insecto Sf9 con el ADN baculoviral *Bac-N-Blue* y con el vector pMelBacA- α LTX, obtener baculovirus recombinantes que tengan insertado en su genoma el cADN de la α LTX.
3. Determinar las condiciones óptimas de expresión de la α LTX recombinante en células de insecto H5 infectadas con los baculovirus recombinantes, variando los parámetros de multiplicidad de infección y tiempo de infección.
4. Optimizar el proceso de purificación de la α LTX recombinante.
5. Estudiar la respuesta inmune generada en conejos inmunizados con preparaciones de la α LTX recombinante.

III. Materiales y Métodos

III.1 Materiales

III.1.1 Reactivos

Los *primers* fueron sintetizados por las compañías Bio-Synthesis, Sigma y en la Unidad de Síntesis del IBT, UNAM. Para la cotransfección en células de insecto se utilizó el ADN viral *Bac-N-Blue* (Invitrogen). El sustrato cromogénico utilizado para la identificación de las placas virales recombinantes fue el X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido) (Research Organics, Inc). 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.

III.1.2 Enzimas

Las enzimas de restricción que se utilizaron fueron de New England Biolabs, Boehringer e Invitrogen. La Taq polimerasa fue de New England Biolabs, la T4 DNA Ligasa fue de Invitrogen, el fragmento Klenow de la DNA polimerasa I de *E. coli* y la Fosfatasa Alcalina son de Roche.

III.1.3 Vectores

En este trabajo se usó el vector de secuenciación pCR2.1-TOPO, así como el vector para recombinación en el sistema de baculovirus pMelBacA, ambos de Invitrogen.

III.1.4 Kits

Para la purificación de los fragmentos de ADN obtenidos por digestión enzimática o mediante la técnica de PCR, separados por electroforesis en geles de agarosa, se utilizó el *High Pure PCR Product Purification Kit* (Roche). Para purificar plásmido en pequeña escala se utilizó el *High Pure Plasmid Isolation Kit* (Roche) y la purificación de plásmidos a gran escala se realizó utilizando el *Plasmid Midiprep Kit* (Biorad).

III.1.5 Células

Las células competentes utilizadas en la transformación por choque térmico de las ligaciones pMelBacA- α LTX fueron de la cepa de *E. coli* XL2-Blue Ultracompetent Cells (Stratagene). Las células competentes utilizadas para transformar por choque térmico la ligación pMelBacA- α LTX-NT, fueron de la cepa de *E. coli* MAX Efficiency DH5 α Competent Cells, de Invitrogen. Para la clonación de los productos de PCR en el vector pCR2.1TOPO se utilizaron células XL1-Blue de Stratagene. Las células competentes utilizadas en la transformación por choque térmico de las clonaciones de los productos de PCR 5'X-enlarge1 y 5'X-enlarge 2 en el vector pCR2.1 TOPO fueron de la cepa de *E. coli* XL2-Blue Ultracompetent Cells (Stratagene). Para la clonación del fragmento de anquirinas elongado en el vector pMelbacA se utilizaron células XL1-Blue Supercompetentes de Stratagene.

La obtención y titulación de los virus recombinantes se realizó en la línea celular Sf9 (ATCC CRL-1711), proveniente del ovario de pupa del lepidóptero *Spodoptera frugiperda*. 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*. Todos los cultivos se realizaron con células del mismo lote celular mantenido en nitrógeno líquido.

III.1.6 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 fetal de ternera y al 0.5% de pluronic F-68. 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.

III.1.7 Animales

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

III.2 Clonación del cADN de la α LTX en el vector pMelBacA

Los vectores pCR2.1-TOPO- α LTX y pMelBacA fueron digeridos con las enzimas de restricción *BamH* I y *Sal* I. Posteriormente el vector pMelBacA fue desfosforilado utilizando Fosfatasa Alcalina. 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* siguiendo el protocolo sugerido por los proveedores: se le agregan 100 μ L de células competentes a la ligación y la mezcla se deja en hielo durante 30 minutos, se le da luego un choque térmico de 30 segundos a 42°C e inmediatamente después se pone en hielo por 1 min. Las células se recuperaron con medio SOC durante 1 hora a 37°C y se sembraron en placas Petri con medio LB-agar y 30 μ g/mL de ampicilina para la selección de los transformantes.

Para obtener la construcción pMelBacA- α LTX-NT partimos de una de las clonas de pMelBacA- α LTX, la cual fue digerida con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Sal* I. Luego de rellenar los extremos del vector con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, los dos fragmentos que resultaron de la digestión fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa. La banda de interés, que corresponde al fragmento de pMelBacA- α LTX-NT, fue aislada utilizando el procedimiento descrito anteriormente. El fragmento de interés fue ligado y posteriormente transformado en células de *E. coli* DH5 α de igual forma a la descrita para la construcción pMelBacA- α LTX.

Las clonas se secuenciaron por el método de dideoxinucleótidos terminadores de la síntesis de cadena (Sanger et al., 1977) en la Unidad de Síntesis del Instituto de Biotecnología. La secuencia de los *primers* utilizados para la secuenciación se muestran en la Tabla 1 y su localización dentro del gen de la α LTX, en la Fig. 5.

Materiales y Métodos

AATT**AAAATAATAACCATCTCGC**AAATAAAATAAGTAT**TTTACTGTTTTCGTAACAGTTTTG**TAATAAAAAAACCTATAAAT **ATG**
 TTAAT**TTTTATTATTGGTAGAGCG**TTTTATTTATTCAT**AAATGACAAAAGCATTGTCAAAA**CATTATTTTTTTGGATATTTA **TAC**

BacFwd → FwdPolh →

AAA TTC TTA GTC AAC GTT GCC CTT GTT TTT ATG GTC GTA TAC ATT TCT TAC ATC TAT GCG C1aI
 TTT AAG AAT CAG TTG CAA CGG GAA CAA AAA TAC CAG CAT ATG TAA AGA ATG TAG ATA CGC CTA

CGA TGG **BamHI** GGA TCC GAA GGA GAA GAA TTA ACT TTA GAT GAA AAA GCA GAA ATA TGC TCA GAA TTA
 GCT ACC **CCT AGG CTT CCT CTT CTT AAT TGA** AAT CTA CTT TTT CGT CTT TAT ACG AGT CTT AAT

5'V →

GAA CTC CAA CAA AAA TAT GTA GAT ATA GCT TCC AAT ATT ATT GGC GAT CTT TCC TCT CTT CCA
 CTT GAG GTT GTT TTT ATA CAT CTA TAT CTA AGG TTA TAA TAA CCG CTA GAA AGG AGA GAA GGT

ATG GTT GGT AAA ATT GTA GGG ACC ATA **PstI** GCT GCA GCC GCG ATG ACC GTT ACC CAT GTT GCT TCT
 TAC CAA CCA TTT TAA CAT CCC TGG TAT CTA CGT CCG CCG TAC **TGG CAA TGG GTA CAA CGA AGA**

5'VIII →

GGG AGG TTA **EcoRV** GAT ATC GAG CAG ACG TTG TTG GGT TGC AGT GAC TTA CCT TTC GAT CAG ATT AAG
 CCC TCC AAT CTA TAG CTC GTC TGC AAC AAC CCA ACG TCA CTG AAT GGA AAG CTA GTC TAA TTC

GAA GTT CTG GAA AAG AGG TTC AAC GAA GTA GAC CGG AAG TTG GAA AGT CAC AGT GCG GCT CTA
 CTT CAA GAC CTT TTC TCC AAG TTG CAT GCT GCG CTT AAC CTT TCA GTG TCA CCG CGA GAT

GAG GAA ATC **ACT AAA CTG GTA GAG AGA AGT** ATA TCC GCG GTA GAA AAA ACA CGG AAG CAG ATG
 CTC CTT TAG **TGA TTT GAC CAT CTC TCT TCA** TAT AGG CGC CAT CTT TTT TGT GCC TTC GTC TAC

3'IV →

AAT AAG AGG TTT GAT GAA **GTC ATG AAG TCT ATT CAG GAC GCA AAA** GTT TCC CCC ATT GTT TCG
 TTA TTC TCC AAA CTA CTT CAG TAC TTC AGA TAA GTC CTG CGT TTT CAA AAG GGG TAA CAA AGC

AAA ATA AAT AAC TTT GCA AGA TAT TTT GAT ACT GAA AAG GAA AGA ATC CGT GGT TTA AAG TTA
 TTT TAT TTA TTG AAA CGT TCT ATA AAA CTA TGA CTT TTC CTT TCT TAG GCA CCA AAT TTC AAT

AAT GAT TAT ATT CTT AAG CTT GAA GAA CCA AAT GGC ATA CTA CTT CAT TTC AAA GAG TCG CGA
 TTA CTA ATA TAA GAA TTC GAA CTT CTT GGT TTA CCG TAT GAT GAA GTA AAG TTT CTC AGC GCT

ACT CCA AAG GAT GAT AGT TTA CAA GCT CCT TTA TTC AGT ATT ATT CAA GAA GGA TAT GCA GTA
 TGA GGT TTC CTA CTA TCA AAT GTT CGA GGA AAT AAG TCA TAA TAA GTT CTT CCT ATA CGT CAT

CCC AAA TCA ATT GAT GAC GAA TTA GCT TTT AAA GTT CTC TAT GCA TTG CTG TAT **KpnI** GGT ACC CAG
 GGG TTT AGT TAA CTA CTG CTT AAT CGA AAA TTT CAA GAG ATA CGT AAC GAC ATA CCA TGG GTC

NdeI ACA TAT GTC TCG GTT ATG TTT TTT CTC CTA GAA CAA TAC TCT TTC CTG GCT AAC CAT TAT TAC
 TGT ATA CAG AGC CAA TAC AAA AAA GAG GAT CTT GTT ATG AGA AAG GAC CGA TTG GTA ATA ATG

5'IX →

GAG AAA GGA GAT TTA GAA AAG TAT GAT GAA TAC TTT AAT AAC CTT AAT AAT GTA TTT TTA GAT
 CTC TTT CCT CTA AAT CTT TTC ATA CTA CTT ATG AAA TTA TTG GAA TTA TTA CAT AAA AAT CTA

TTC AAA TCA TCA CTT GTG GGT ACC GGC ACA TCT AAT AAC GAA GGT CTT ATT GAC AGA GTG CTT
 AAG TTT AGT AGT GAA CAC CCA TGG CCG TGT AGA TTA TTG CTT CCA GAA TAA CTG TCT CAC GAA

CAA GAT TTA ATG ACT GTT AAG AAT AGC GAG TTC TTA GGA ATT GGA AAA AAC GGT GTA GAT GAA
 GTT CCA AAT TAC TGA CAA TTC TTA TCG CTC AAG AAT CCT TAA CCT TTT TTG CCA CAT CTA

ATG CTG AAC GAG AAA ATA AAT TTA TTT AAT AAA ATT AAG GAA GAA ATC GAA AGC AAG CAG AGA
 TAC GAC TTG CTC TTT TAT TTA AAT AAA TTA TTT TAA TTC CTT CTT TAG CTT TCG TTC GTC TCT

ATG ACA ATA AGT GAG ACA CCA GAA AAT TTT GCG CAA ATT TCA TTT GAC AAA GAT ATA ACA ACT
 TAC TGT TAT TCA CTC TGT GGT CTT TTA AAA CGC GAT TTA AAG AGT AAA CTG TTT CAT TAT TGT TGA

CCC ATC GGA GAT TGG AGA GAT GGT CGG GAA GTA CGT TAC GCT GTA CAA TAT GCA AGT GAA ACC
 GGG TAG CCT CTA ACC TCT CTA CCA GCC CTT CAT GCA ATG CGA CAT GTT ATA CGT TCA CTT TGG

TTA TTT TCT AAA ATC GGT CAT TGG TCT GAT CCC TTG AGT GTA AGA GAG AAA **SphI** GCA TGC CCT ACT
 AAT AAA AGA TTT TAG CCA GTA ACC AGA CTA GGG AAC TCA CAT TCT CTC TTT CGT ACG GGA TGA

CTC AGA ATG CCA GTT GAC CAA ACC CGA AGA AAC GTA **CTT GTT TTC AGA AAA TTT GAC** AAC AGC
 GAG TCT TAC GGT CAA CTG GTT TGG GCT TCT TTG CAT **GAA CAA AAG TCT TTT AAA CTG** TTG TCG

5'new →

AAA **BstXI** CCC CAA CTG GTT GGC GAA ATC **ACA CCA TAC CTA TCA AAT TTC ATT GAC** C1aI **ATC GAT AGA GAT**
 TTT GGG GTT GAC CAA CCG CTT TAG **TGT GGT ATG GAT AGT TTA AAG TAA CTG** TAG **CAT TCT CTA**

3'VI ← 5'IV →

CTT TAT AAT GCC GCT AGT AAT CCT GAT TCA GCT GTA GGT TTT AAG GAA TTC ACG AAA TTA AAC
 GAA ATA TTA CGG CGA TCA TTA GGA CTA AGT CGA CAT CCA AAA TTC CTT AAG TGC TTT AAT TTG

5'X → 3'II →

TAT GTT GGT GCT AAT ATT AGA GCA ACT TTC GAT CAA GGA AGA ACA GTT TTT CAT GCC GCA GCA
 ATA CAA CCA CGA CCA TTA TAA TCT CGT TGA AAG CTA GGT CCA CCA TCA AAG CTA GGT CCG CGT CGT

AAA AGT GGT AAC GAC AAG ATT ATG TTT GGA TTA ACG TTC TTA GTA AAG TCT ACT GAA TTA AAC
 TTT TCA CCA TTG CTG TTC TAA TAC AAA CCT AAT TGC AAG AAT CAT TGC AAG AAT TTC AGA TGA CTT AAT TTG

CAA CCA GAT AAA AAG GGT TAC ACT CCT ATT CAT GTA **PstI** GCT GCA GAT AGT GGA AAC GCT GGT ATT
 GTT GGT CTA TTT TTC CCA ATG TGA GGA TAA GTA CAT CCA AGA TAT TTA AGT TTT TGT ATG GTA AAG GAA GGT TGT

CCA CTG CAC TTG GCT GCT CAG CGC GGA TTT GTA AAT ACT TTT CAA AGA TTA ATG GAG AGT CCT
 GGT GAC GTG AAC CGA CGA GTC GCG CCT AAA CAT TTA TGA AAA GTT TCT AAT TAC CTC TCA GGA

GAA ATA AAT ATA AAT GAA AGA GAT AAA GAT GGA TTC ACG CCG CTA CAT TAT GCT GTT CGG GGC
 CTT TAT TTA TAT TTA CTT TCT CTA TTT CTA CCT AAG TGC GGC GAT GTA ATA CGA CAA GCC CCG

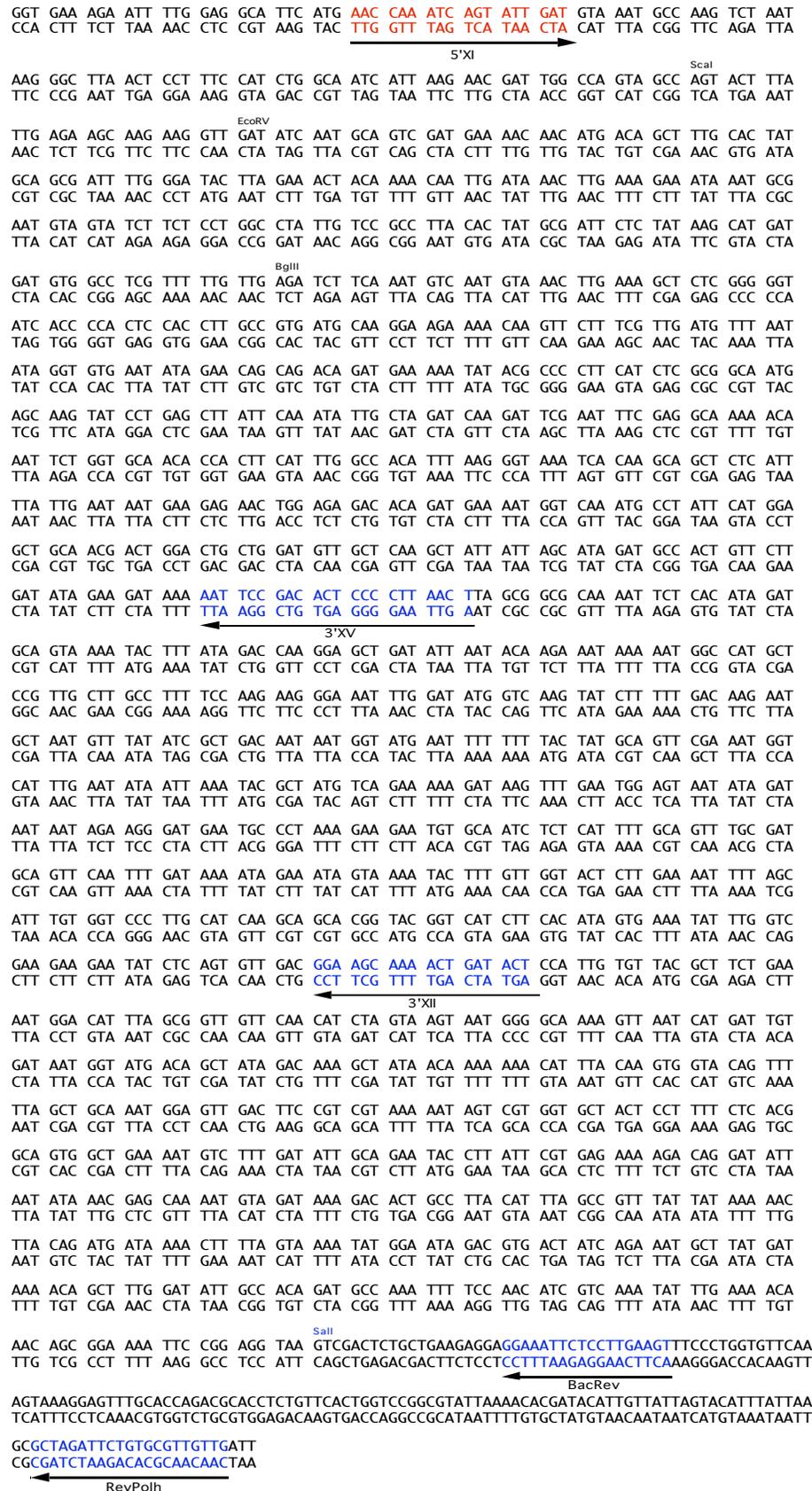


Fig. 5. Localización de los primers utilizados para secuenciar las construcciones de pMelBacA-αLTX. La secuencia es de la αLTX de *L. mactans* reportada por Prud'Homme (2004)

Tabla 1. Secuencia de los *primers* utilizados en este trabajo. Las secuencias van del extremo 5' al 3'.

Nombre	Secuencia
5'IV	AT TTCATTGACATTGATAGAGA
5'V	CCCGGATCCGAAGGAGAAGAATTA ACT
5'VIII	TTTGGATCCACCGTTACCCATGTTGCTTC
5'IX	TTTGGATCCACATATATCTCGGTTATGTTT
5'X	CCCGGATCCCTTTATAATGCCGCTAGTAAT
5'XI	AACCAAATCAGTATTGAT
3'II	AAAACCGGGATT ACCTACAGCTGAATCAGG
3'IV	TTTTCTCTACCAGTTTAGT
3'VI	GGGGTCGACTTAAATGAAATTTGATAGGTATGGTGT
3'XII	AGTATCAGTTTTGCTTCC
3'XV	GGGGTCGACTTAGTTAAGGGGAGTGTCGGAATT
BacFwd	AAATGATAACCATCTCGC
BacRev	ACTTCAAGGAGAATTTCC
FwdPolh	TTTACTGTTTTTCGTAACAGTTTTG
RevPolh	GCTAGATTCTGTGCGTTGTTG
5'new	CCTGTTTTTCAGAAAATTTGAC

III.3 Estrategia para elongar el cADN que codifica para los dominios amino-anquirina de la α LTX

Con el objetivo de adicionar los 72 nucleótidos faltantes del extremo carboxilo del dominio de anquirinas del gen de la α LTX, diseñamos dos *primers* que contenían las secuencias faltantes y los llamamos *enlarge-1* y *enlarge-2*. El *primer* *enlarge-1* consta de 57 nucleótidos, de los cuales 18 hibridan con el extremo carboxilo terminal incompleto del dominio de anquirinas. El *primer* *enlarge-2* está compuesto por 61 nucleótidos e hibrida a su vez con los 18 nucleótidos finales del *primer* *enlarge-1*. La secuencia de ambos *primers* se muestra a continuación:

Enlarge-1: 5'-ttt gac gat gtt gga aaa ttt ggc atc tgt ggc aat atc caa agc tgt ttt atc ata-3'

Enlarge-2: 5'-agt cga ctt acc tcc gga att ttc cgc tgt ttg ttt tca aat att tga cga tgt tgg aaa a-3'

La estrategia para obtener el fragmento faltante del dominio de anquirinas consistió en realizar dos ensayos de PCR utilizando como molde la construcción pMelBacA- α LTX incompleta y los *primers* 5'X y *enlarge-1* en un primer ensayo. Posteriormente el producto de esta amplificación fue utilizado para la segunda reacción de PCR con los *primers* 5'X y

enlarge-2. El esquema de la localización de los *primers* dentro del cADN de α LTX se muestra en la Fig.6.

III.3.1 Clonación de los productos de PCR en el vector pCR2.1TOPO

Los fragmentos obtenidos de las reacciones de PCR con las combinaciones de *primers* 5'X-enlarge-1 y 5'X-enlarge-2 fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa y purificados del gel utilizando el *kit High Pure PCR Product Purification Kit*, de Roche. Los fragmentos purificados se clonaron en el vector pCR2.1TOPO siguiendo las instrucciones del manual *TOPO TA Cloning* de Invitrogen (página5) y la clonación fue transformada en células ultracompetentes *XL2-Blue* (Stratagene) siguiendo el protocolo descrito previamente. Las células transformadas se sembraron en placas Petri con medio LB-agar, 30 μ g/mL de kanamicina y 100 μ g/mL de X-gal para la selección de los transformantes (colonias blancas). El ADN plasmídico de las clonas se aisló y se analizó con diferentes enzimas de restricción.

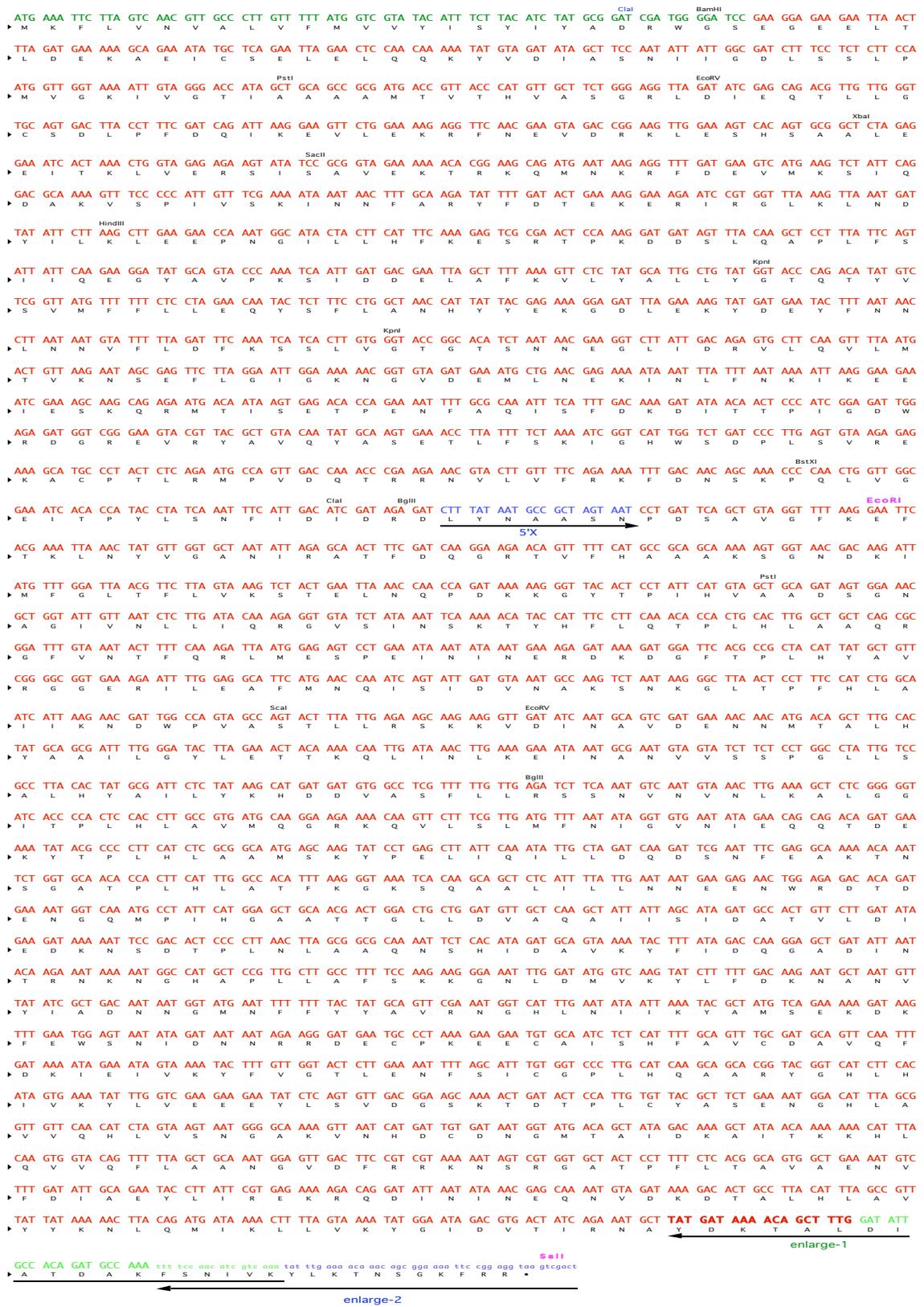


Fig.6. Localización de los *primers* 5'X, enlarge-1 y enlarge-2 dentro de la secuencia de cADN que codifica para los dominios amino-anquirina de la α LTX.

III.3.2 Sustitución del dominio de anquirinas incompleto de la α LTX por el dominio completo en la construcción pMelBacA- α LTX

Con el objetivo de eliminar de la construcción pMelBacA- α LTX incompleta el dominio de anquirinas e insertar el nuevo dominio de anquirinas completo, los vectores pCR2.1-TOPO-5'X-enlarge2 y pMelBacA- α LTX incompleta fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Sal* I. Posteriormente el vector pMelBacA- α LTX incompleta fue desfosforilado utilizando Fosfatasa Alcalina. 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 horas. El producto de la ligación fue transformado en células de *E. coli* XL1 *Blue* supercompetentes siguiendo el protocolo sugerido por los proveedores: se le agregan 100 μ L de células competentes a la ligación y la mezcla se dejó en hielo durante 30 minutos, se le dió luego un choque térmico de 45 segundos a 42°C e inmediatamente después se puso en hielo por 2 minutos. Las células se recuperaron con medio SOC durante 1h a 37°C y se sembraron en placas Petri con medio LB-agar y 30 μ g/mL de ampicilina para la selección de los transformantes.

III. 4 Análisis de las secuencias

Las secuencias nucleotídicas de todas las construcciones obtenidas fueron analizadas utilizando el programa Gene Inspector (Textco, Inc).

III.5 Electroforesis

Todos los geles para análisis de ADN fueron de agarosa al 1%. Las separaciones se llevaron a cabo en *buffer* TAE 1X a 100V.

Los geles para la separación de las proteínas fueron de acrilamida al 10% y en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE), de acuerdo a la técnica descrita por Laemmli en 1970. Las separaciones electroforéticas se realizaron a 10 V/cm.

III.6 Obtención de los baculovirus recombinantes

III.6.1 Cotransfección en células de insecto

Las cotransfecciones con las construcciones pMelBacA- α LTX y pMelBacA- α LTX-NT junto al ADN viral *Bac-N-Blue* se realizaron siguiendo el protocolo descrito en las páginas 9-10 del manual *Bac-N-Blue Transfection and Expression Guide* (Invitrogen).

III.6.2 Ensayo en placas

Células Sf9, cultivadas en medio TNM-FH al 10% de SFT 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 3mL totales. Se incubaron a temperatura ambiente por 30 minutos para permitir su correcta adhesión al fondo de los pozos y se eliminó el medio de cultivo por aspiración. Luego se adicionaron a los pozos 800 μ L de diluciones seriadas del sobrenadante de las cotransfecciones o del sobrenadante de las amplificaciones de los virus, las cuales se realizaron con medio de cultivo TNM-FH al 10% SFT. Las placas de cultivo se sellaron e incubaron en un agitador orbital a razón de 2 oscilaciones/min durante 3h 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% SFT y 300 μ g/mL de X-gal. Luego de 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. La manipulación de las células se realizó siempre en condiciones estériles.

III.6.3 Clonación de las placas virales

Para aislar y preservar las placas virales obtenidas como resultado de los ensayos en placa, se extrajeron las placas azules del medio con agarosa con ayuda de una pipeta Pasteur. Este tapón de agarosa fue dispersado en 200 μ L de medio de cultivo Sf900-II al 0.5% de SFT y almacenado a 4°C.

III.6.4 Amplificación de las placas virales

Para la primera amplificación de las placas virales se sembraron células Sf9, cultivadas en medio Sf900-II sin suero y con una viabilidad superior al 97%, en placas de cultivo de 6 pozos a razón de 1×10^6 células/pozo en 2mL totales. A este cultivo se le adicionaron 100 μ L de las placas virales clonadas y se incubaron durante 4 días a 27°C. El sobrenadante de este cultivo fue recolectado y guardado a 4°C con 0.5% SFT para garantizar una mayor integridad de los virus. La segunda amplificación de los virus se realizó sembrando 30×10^6 células Sf9 en 60 mL de medio Sf900-II, en un matraz de 250 mL. Las células se infectaron con 100 μ L del sobrenadante de la primera amplificación viral y se incubaron a 27°C en agitación. La recolección del sobrenadante de cultivo se realizó 4 días postinfección y se guardó a 4°C con 0.5% SFT.

III.7 Identificación y aislamiento del gen de la α LTX a partir del genoma de los virus recombinantes

III.7.1 Aislamiento del ADN de los virus recombinantes

El ADN viral se aisló siguiendo el protocolo que aparece en el manual *Bac-N-Blue Transfection and Expression Guide* de Invitrogen/página 25. Para ello utilizamos 1mL del sobrenadante de cultivo de la segunda amplificación viral.

III.7.2 Análisis del ADN viral

Utilizando la técnica de PCR, se amplificó el gen de la α LTX fusionado al péptido señal de la melitina (Mel-LTX) a partir del ADN de los virus recombinantes. Se utilizaron los *primers* FwdPolh y RevPolh, que hibridan en los extremos del gen de la poliedrina. También se amplificó el dominio amino de la α LTX fusionado al péptido señal de la melitina con los *primers* FwdPolh y 3'VI.

La secuencia y la ubicación de los *primers* se muestra en la Tabla 1 y en la Fig. 5, respectivamente.

III.8 Expresión y purificación de α LTX recombinante

III.8.1 Estudio de la cinética de expresión de la α LTX recombinante

Para estudiar la expresión de la α LTX recombinante se infectaron células de insecto H5 con los baculovirus recombinantes variando los parámetros de multiplicidad de infección y densidad celular inicial. Los sobrenadantes de cultivo fueron recolectados a las 24, 48, 72 y 96 horas post-infección y se midió la densidad y viabilidad celular por conteo en un hematocitómetro utilizando una solución de Azul de Tripano 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*.

III.8.2 Purificación de la α LTX recombinante siguiendo el protocolo de Volynski et al (1999)

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 48h se les adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete mini EDTA-Free, Roche) y se incubaron nuevamente en agitación durante 30min a 4°C. Posteriormente el pH del cultivo se elevó hasta 8.2 con una solución de Tris-base 1M y se aisló el sobrenadante por centrifugación a 3500 rpm durante 15min. Seguidamente el sobrenadante fue diluido 5 veces con una solución tampón 25mM Tris-HCl pH 8.2 y se pasó a través de un filtro de intercambio aniónico (Sartobind Q15, Sartorius). Luego de varios lavados, las proteínas adheridas al filtro se eluyeron con 3mL de una solución tampón de 25mM Tris-HCl, 1M NaCl pH 8.2 e inmediatamente se diluyeron 10 veces con la solución tampón 25mM Tris-HCl pH 8.2, resultando en una concentración final de NaCl de 0.1M. Este purificado se pasó a través de una columna MonoQ (Pharmacia) equilibrada con una solución tampón de 25mM Tris-HCl, 0.1M de NaCl pH 8.2. La proteína recombinante fue eluída de la columna con un gradiente de NaCl desde 0.1M hasta 0.5M en la misma solución tampón. Las fracciones obtenidas durante la cromatografía fueron analizadas por SDS-PAGE y *Western Blot*.

III.8.3 Ensayo en tubo para determinar pH de trabajo

A través de este ensayo se mide la capacidad de interacción de la proteína que se desea purificar mediante cromatografía de intercambio aniónico con una resina específica en función del pH. En este caso utilizamos la resina Q-Sepharosa y diferentes soluciones tampones a distintos pHs: Tris-HCl 25mM pH 8.3, 8 y 7.5; Bis-Tris-propano-HCl 20mM pH 7 y 6.5; L-Histidina 20mM, pH 6. Estas soluciones tampones son las recomendadas en el *Current Protocols in Protein Sciences*, Intercambio aniónico (2007). Brevemente, se adicionaron 500µL de resina en tubos eppendorf y se lavaron 3 veces con cada una de las soluciones tampones. Al término de los lavados, la resina se resuspendió en 500µL de estas soluciones. Seguidamente se adicionaron otros 500µL con diferentes soluciones de Tris-HCL a diferentes pHs que contenían la mezcla de proteínas a analizar y se incubaron con la resina durante 30 minutos a temperatura ambiente en un agitador orbital. Posteriormente la resina se dejó asentar durante 2h a 4°C y se midió la presencia de la αLTX en el sobrenadante mediante ensayos de *Western blot*.

III.8.4 Purificación de αLTX recombinante utilizando un protocolo alternativo

Se sembraron células H5 en medio de cultivo SF900-II a una densidad inicial 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 48h se les adicionó una mezcla de inhibidores de proteasas (Complete mini EDTA-Free, Roche) y se incubaron nuevamente en agitación durante 30min a 4°C. El sobrenadante de cultivo se aisló por centrifugación a 3500 rpm durante 30min y se diluyó 1/2 con una solución tampón de L-histidina 20mM pH 6. En estas condiciones, se pasó 2 veces a través de un filtro de intercambio aniónico (Sartobind Q15, Sartorius) y luego de varios lavados con la misma solución, las proteínas adheridas al filtro se eluyeron con 3mL de la solución tampón de L-His 20mM y 0.5M NaCl pH 6. El eluato se dializó contra la solución de L-His 20mM para eliminar la sal y se pasó a través de una columna MonoQ (Pharmacia) equilibrada con la solución tampón de L-His 20mM pH6. La proteína recombinante fue eluida de la columna con un gradiente de NaCl desde 0 hasta 0.5M en la misma solución tampón.

III.9 Tinción neutral de proteínas con nitrato de plata

Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE y se visualizaron mediante un protocolo de tinción neutral con nitrato de plata que se describe a continuación. Los geles de acrilamida fueron sumergidos en una solución de etanol al 30% y ácido acético al 10% para la fijación de las proteínas durante un tiempo mínimo de 3h. Luego se decantó esta solución y se realizaron dos lavados con una solución de etanol al 30% durante 30min. Se eliminó el etanol y se realizaron 3 lavados con agua destilada durante 10min. Posteriormente, los geles se incubaron con una solución de nitrato de plata al 0.1% durante 30min. Esta solución se eliminó y se realizó un lavado de 20 segundos con agua destilada. La visualización de las bandas proteicas en los geles se realizó con una solución de carbonato de sodio al 2.5% y 0.02% de formaldehído. Para detener la reacción se utilizó una solución de ácido acético al 1%. Luego se lavaron los geles con agua destilada.

III.10 Western Blot

Para los ensayos de *Western Blot* las proteínas y los componentes del veneno se separaron mediante SDS-PAGE y luego fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa (Bio-Rad). El gel y los papeles de filtro (Whatman 3MM) así como la membrana fueron sumergidos en la solución de transferencia para cámaras semi-secas durante 5 minutos. El *sandwich* quedó de forma que el gel y la membrana se intercalaron entre 6 papeles de filtro y la transferencia se realizó durante 1h a 400mA en una cámara de electrotransferencia semi-seca HEP-1 (OWL). Para la inmunodetección de la α LTX recombinante primeramente se bloqueó la membrana con una solución al 5% de leche descremada en una solución salina tamponada con Tris-HCl, 0.05% Tween 20 (TBST). Luego de tres lavados con TBST 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 de TBST y 0.1% de leche descremada. De igual forma, 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. Se volvió a lavar la membrana 3 veces con TBST y el reconocimiento de la α LTX recombinante por el suero se visualizó por incubación de la membrana en una solución de BCIP y NBT (Zymed) al 10%. La reacción se detuvo con una solución de 5mM EDTA.

III.11 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de cada preparación de proteínas se hizo con el *kit Micro BCA Protein Assay Reagent* (Pierce): el ácido Bicinconínico (BCA) en su forma de sal de sodio reacciona de manera sensible, estable y específica con el ión cuproso. La presencia de enlaces peptídicos y la contribución de las cadenas laterales de algunos aminoácidos (especialmente cisteína, triptofano y tirosina) son los responsables de la generación de cobre reducido. La reacción colorimétrica se da por la interacción de dos moléculas de BCA con un ión cuproso; este complejo es soluble en agua y absorbe a 562nm (Smith et al., 1985). Para este ensayo se hace una curva patrón con BSA a concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 $\mu\text{g/ml}$.

III.12 Estudio de la toxicidad de la αLTX recombinante

Para evaluar la capacidad de la αLTX recombinante de producir los mismos síntomas de envenenamiento producidos por el veneno de la araña *L. mactans*, ratones de la cepa CD1 fueron inyectados por la vena caudal con 500 μL del sobrenadante de cultivo de células H5 infectadas con los baculovirus recombinantes o con diferentes preparaciones de la αLTX 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.

III.13 Inmunizaciones con la αLTX 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 αLTX . Este estudio se realizó con el objetivo de evaluar si la toxina era capaz de generar una respuesta inmune en conejos que reconociera y neutralizara los efectos del 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 tiempo que duró el protocolo. La primera dosis se administró emulsificada en ACF, y las dosis posteriores se administraron con AIF para el conejo 25 y alternando AIF y alúmina para el conejo 27.

*III.14 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 100mM carbonato/bicarbonato a pH 9.6 y se incubaron durante toda la noche a 4°C. Los pozos se bloquearon con una solución de 50mM Tris-HCl pH 8, 0.5% gelatina y 0.2% de Tween 20 durante 2h a temperatura ambiente. Los sueros de los conejos, tanto preinmunes como los obtenidos luego de las sangrías, fueron diluidos 1/30 y posteriormente se diluyeron de forma seriada 1/3 con la solución de reacción (50mM Tris/HCl, 0.5M NaCl, 0.1% gelatina y 0.05% Tween 20) y se incubaron con el veneno durante 1h 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 1h 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 405nm. Los lavados correspondientes entre cada paso de incubación se realizaron con una solución de 50mM Tris-HCl a pH 8, 150mM NaCl y 0.05% Tween 20. Los datos obtenidos fueron procesados mediante el programa GraphPad Prism (Versión 2; GraphPad Software, Inc. San Diego, CA).

IV. Resultados

IV.1 Clonación del cADN de la α LTX en el vector pMelBacA

Como material de partida, contamos con el cADN correspondiente a los dominios amino-anquirinas de la α LTX clonado en el vector de secuenciación pCR2.1TOPO (Prud'Homme, 2004), así como con el vector de transferencia baculoviral pMelBacA (Fig. 7). Para subclonar el cADN de la α LTX en el vector pMelBacA de manera que quedara en fase con la secuencia del péptido señal de la melitina, presente en dicho vector, ambos vectores fueron digeridos con las enzimas de restricción *BamH* I y *Sal* I. Posteriormente, el vector pMelBacA fue desfosforilado con Fosfatasa Alcalina. El inserto de 3.5 kb correspondiente a la α LTX y el vector PMelBacA (4.8 kb) se separaron del resto de los fragmentos de la digestión mediante una electroforesis en gel de agarosa, de donde se cortaron y purificaron para su posterior ligación.

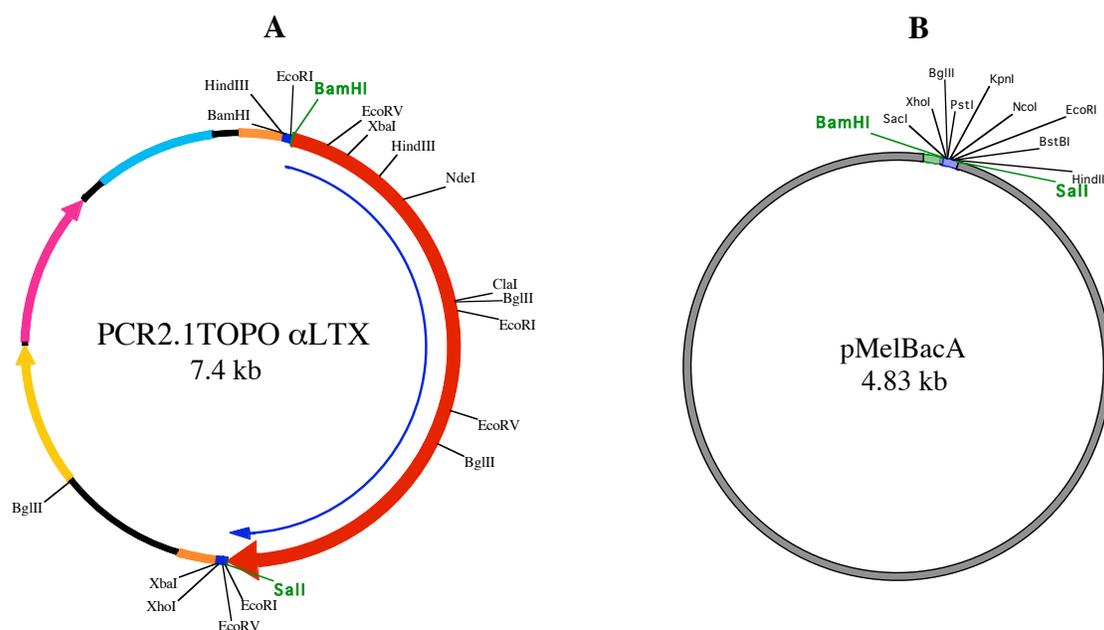


Fig. 7 Esquema de la construcción de la α LTX clonada en el vector pCR2.1-TOPO (A) y del vector pMelBacA (B), donde se señalan los principales sitios de restricción. Las enzimas de restricción utilizadas en la subclonación del gen de la α LTX se muestran en verde y el cADN de la α LTX se muestra en rojo.

El producto de la ligación fue transformado en células de *E. coli* XL2 *Blue ultracompetentes*, las cuales se sembraron en una placa de medio LB con ampicilina. De las 14 colonias que crecieron en la placa donde se sembró la ligación, se seleccionaron 6 y se resembraron por separado en medio LB líquido con el mismo antibiótico. Se purificó el ADN plasmídico de las colonias sembradas y fue digerido con la enzima de restricción *BamH* I. De los 6 plásmidos analizados, tres tenían el tamaño calculado para el vector pMelBacA- α LTX (8.25 kb), y correspondieron a las colonias bacterianas que exhibieron el crecimiento más lento. Seguidamente realizamos un análisis de restricción más exhaustivo de estos tres vectores con las enzimas de restricción *Cla* I, *Pst* I y *Bgl* II. El patrón de bandas observado luego de separar los productos de la digestión enzimática en un gel de agarosa fue el esperado para la construcción pMelBacA- α LTX en las 3 clonas analizadas, excepto para la enzima *Cla* I (Fig.8). Una de estas tres clonas se resembró en 50 mL de medio LB para purificar mayores cantidades de ADN plasmídico y procedimos a su secuenciación.

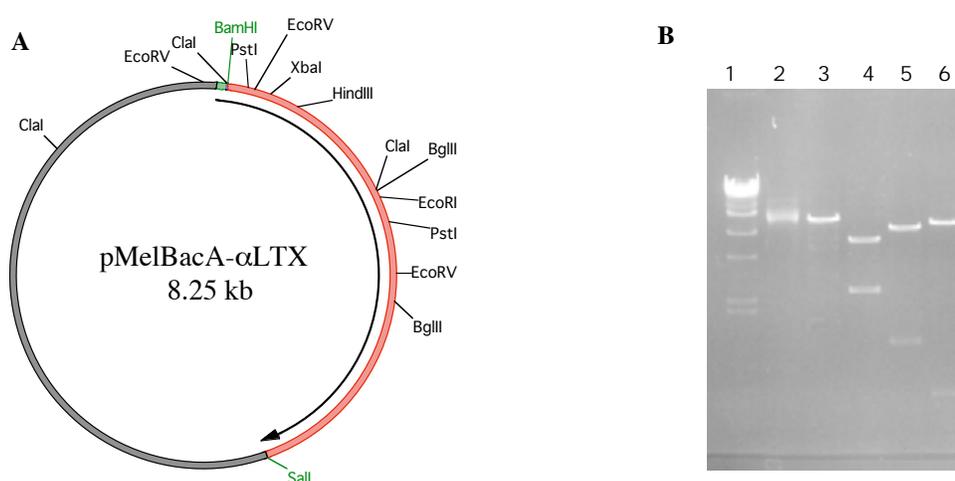


Fig. 8. A. Esquema del vector pMelBacA que contiene el cADN amino-anquirinas de la α LTX. Se señalan los principales sitios de restricción y las enzimas utilizadas en la subclonación se muestran en verde. En rojo se destaca la región codificante del cADN de la α LTX fusionada al péptido señal de la melitina, el cual se muestra de color verde. Con flecha negra se representa la traducción a proteína. B. Análisis de restricción de la clona 4 de pMelBacA- α LTX. 1)ppM λ Hind III: 23, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0 y 0.56 kb, 2) vector sin digerir, 3) *BamH* I, 4) *Cla* I, 5) *Pst* I, 6) *Bgl* II. Este patrón es representativo de las 3 clonas analizadas.

IV.2 Elongación del dominio de anquirinas incompleto de la α LTX

El análisis de la secuencia nucleotídica del vector pMelBacA- α LTX, arrojó que faltaban 72 nucleótidos correspondientes al extremo carboxilo del dominio de anquirinas del cADN de la α LTX, los cuales también estaban ausentes en la construcción de partida pCR2.1 TOPO- α LTX. Con el objetivo de adicionar los nucleótidos faltantes, diseñamos dos *primers* sobrelapados que contenían la secuencia faltante y los llamamos enlarge-1 y enlarge-2. La estrategia para obtener el fragmento final del dominio de anquirinas consistió en realizar dos ensayos de PCR utilizando como molde la construcción pMelBacA- α LTX incompleta y los *primers* 5'X, enlarge-1 y enlarge-2. Primeramente, realizamos un ensayo de PCR utilizando como molde la construcción pMelBacA- α LTX incompleta y los *primers* 5'X y enlarge-1. Como resultado, obtuvimos una banda de 2.19 kb correspondiente al dominio de anquirinas (Fig. 9), la cual fue purificada a partir del gel de agarosa y clonada en el vector de secuenciación pCR2.1 TOPO. La transformación se realizó en células de *E. coli* de la cepa XL2 *Blue* ultracompetentes y las colonias resultantes se sembraron en medio LB con kanamicina y X-gal para la selección de los transformantes (colonias blancas).

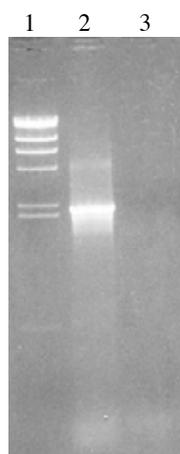


Fig.9. Gel de agarosa donde se observa el fragmento de 2.19 kb correspondiente al producto de la amplificación y elongación del dominio de anquirinas del cADN de la α LTX

- 1: ppM λ Hind III: 23, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0, y 0.56 kb
- 2: PMelBacA- α LTX + 5'X + enlarge-1
- 3: c(-) 5'X+ enlarge-1

Como resultado de la transformación se obtuvieron numerosas colonias, de las cuales sembramos 9 en medio LB líquido para la extracción de ADN plasmídico. Una digestión preliminar de los plásmidos obtenidos con la enzima de restricción *EcoR* I, seguida de una electroforesis en un gel de agarosa, arrojó que las clonas 7 y 2 tenían insertada la banda amplificada por PCR dentro del vector pCR2.1 TOPO. Posteriormente, realizamos un chequeo de restricción más exhaustivo de estas clonas con las enzimas de restricción *Xho* I,

Bgl II y *Pst* I, comprobando que la banda 5'X-enlarge-1 se insertó en la orientación directa en la clona 7 y en dirección invertida en la clona 2 (Fig. 10).

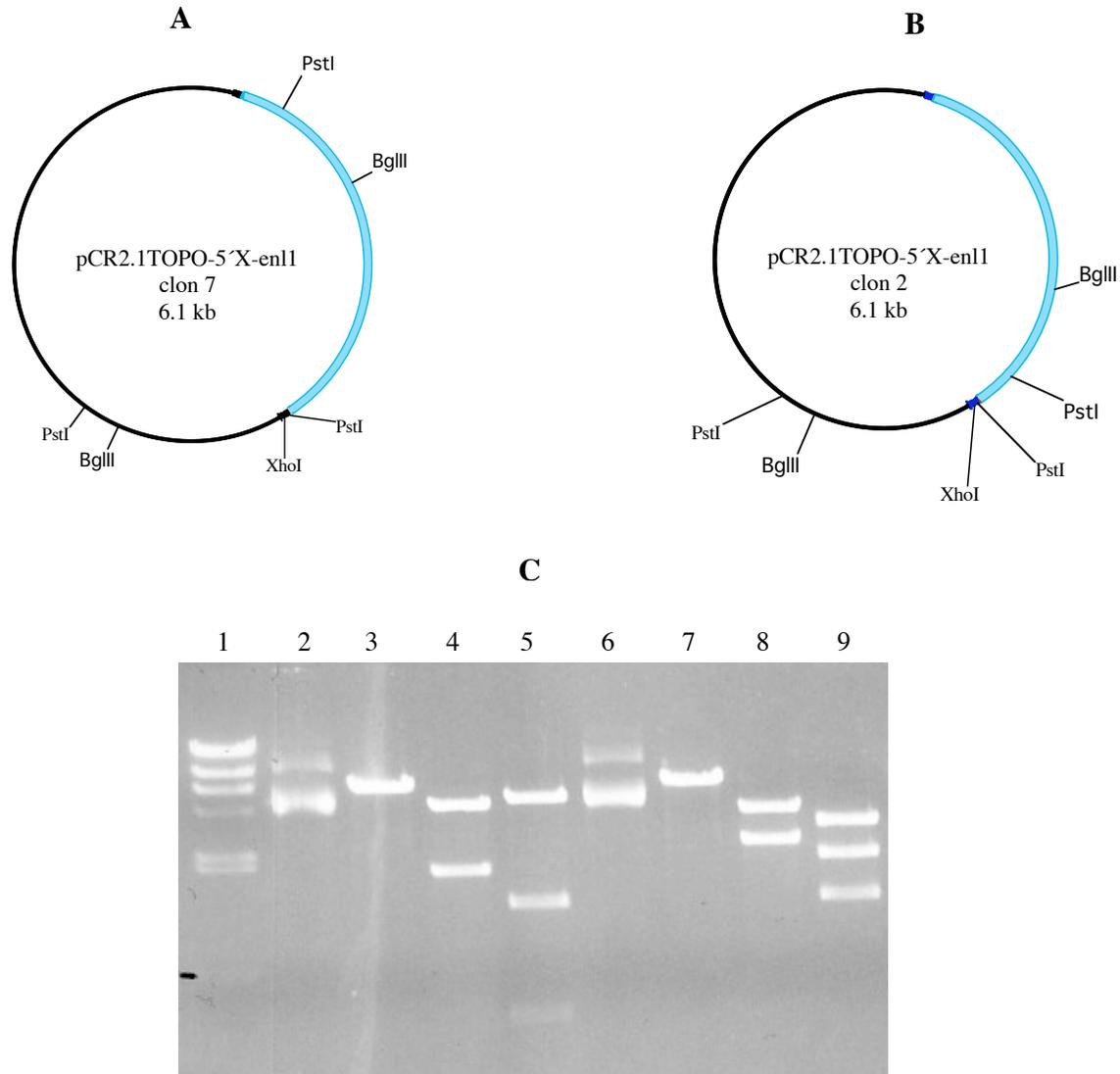


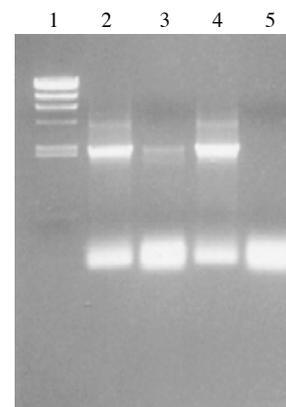
Fig. 10. Clonación en el vector pCR2.1TOPO del dominio de anquirinas amplificado por PCR con los *primers* 5'X y enlarge-1. A) Construcción *in silico* del vector pCR2.1TOPO-5'X-enlarge-1 clona 7. B) Construcción *in silico* del vector pCR2.1TOPO-5'X-enlarge-1 clona 2. Los fragmentos amplificados por PCR se muestran en gris.

C) Análisis de restricción del plásmido pCR2.1 TOPO-Banda 5'X-enlarge-1 aislado de las colonias 2 y 7. 1) ppM λ Hind III: 23, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0, y 0.56 kb. 2) 2-sin digerir, 3) 2-*Xho* I, 4) 2-*Bgl* II, 5) 2-*Pst* I, 6) 7-sin digerir, 7) 7-*Xho* I, 8) 7-*Bgl* II, 9) 7-*Pst* I.

Tomando como molde el ADN plasmídico aislado de las clonas 2 y 7, realizamos otro ensayo de PCR con el objetivo de completar el dominio de anquirinas de la α LTX. El resultado de este ensayo se muestra en la Fig.11, donde se observa una banda de 2.23 kb como producto de la amplificación a partir del vector pCR2.1TOPO-5'X-enlarge-1 clona 2 utilizando los *primers* 5'X y enlarge-2 (carril 3). No se logró amplificar el dominio de anquirinas a partir del ADN plasmídico de la clona 7 con los mismos *primers* (carril 5). Como control positivo del experimento utilizamos los *primers* 5'X y enlarge-1 (carriles 2 y 4), obteniéndose la banda esperada de 2.19 kb en ambas clonas.

Fig.11. Gel de agarosa donde se observan los productos de PCR de la amplificación del vector pCR2.1TOPO-5'X-enlarge-1 proveniente de las clonas bacterianas 2 y 7.

- 1: ppM λ Hind III: 23, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0, y 0.56 kb.
- 2: vector -c2+ 5'X+enlarge-1
- 3: vector -c2+ 5'X+enlarge-2
- 4: vector -c7+ 5'X+enlarge-1
- 5: vector -c7+ 5'X+enlarge-2



La banda amplificada con los *primers* 5'X y enlarge-2 proveniente de la clona 2 fue purificada del gel de agarosa y clonada nuevamente en el vector pCR2.1TOPO. Seguidamente, esta construcción fue transformada en células de *E. coli* de la cepa XL2 Blue, las cuales se sembraron en placas de medio LB con kanamicina y X-gal. De las colonias blancas obtenidas, sembramos 6 en medio LB líquido para la purificación de su ADN plasmídico y posterior digestión con la enzima de restricción *Sal* I con el propósito de detectar la presencia del producto de PCR insertado en el vector pCR2.1TOPO. De las 6 clonas analizadas sólo una contenía el inserto 5'X-enlarge-2 en el vector pCR2.1TOPO, por lo que realizamos un análisis de restricción más exhaustivo de esta clona con las enzimas de restricción *EcoR* I, *Bgl* II, *EcoR* V, *Xho* I y *BamH* I (Fig. 12).

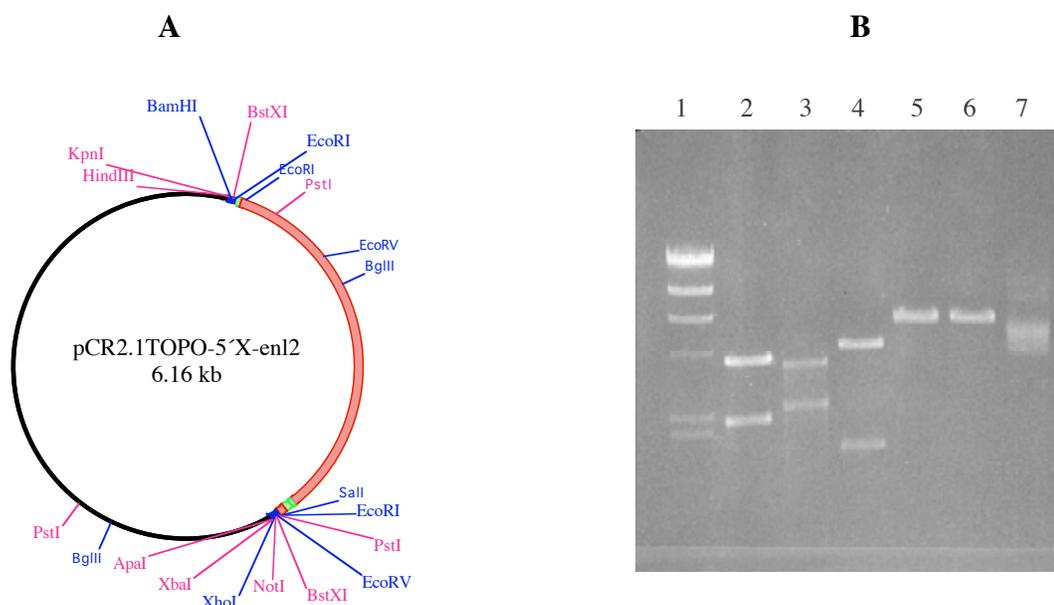


Fig. 12. Clonación en el vector pCR2.1TOPO del dominio de anquirinas amplificado por PCR con los *primers* 5'X y enlarge-2. A) Construcción *in silico* del vector pCR2.1TOPO-5'X-enlarge-2. B) Análisis de restricción del vector. 1) ppM λ Hind III: 23, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0, y 0.56 kb. 2) *EcoR* I, 3) *Bgl* II, 4) *EcoR* V, 5) *BamH* I, 6) *Xho* I, 7) sin digerir.

Una vez alargado el extremo carboxilo del dominio de anquirinas procedimos a clonarlo en el vector pMelBacA. Para ello partimos de la construcción pMelBacA- α LTX incompleta, reemplazando el viejo dominio de anquirinas por el nuevo dominio completo. Los vectores pMelBacA- α LTX incompleto y pCR2.1TOPO-5'X-enlarge-2 fueron digeridos con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Sal* I y se aislaron los fragmentos pMelBacA- α LTX amino y 5'X-enlarge-2 provenientes de cada vector, respectivamente. Estos fragmentos fueron ligados y transformados en células XL1 *Blue* Supercompetentes. Como resultado de la transformación crecieron más de 60 colonias, de las cuales sembramos 6 en medio LB líquido para el aislamiento del ADN plasmídico. Luego de una digestión con la enzima de restricción *Sal* I, seleccionamos dos colonias que mostraron el tamaño de inserto correcto y las digerimos con las enzimas de restricción *BamH* I, *EcoR* I, *EcoR* V, *Bgl* II y *Cla* I, mostrando ambas el patrón de restricción esperado (Fig. 13). La clona 1 fue resebrada en 50mL de medio LB líquido y se aisló el ADN plasmídico para su secuenciación.

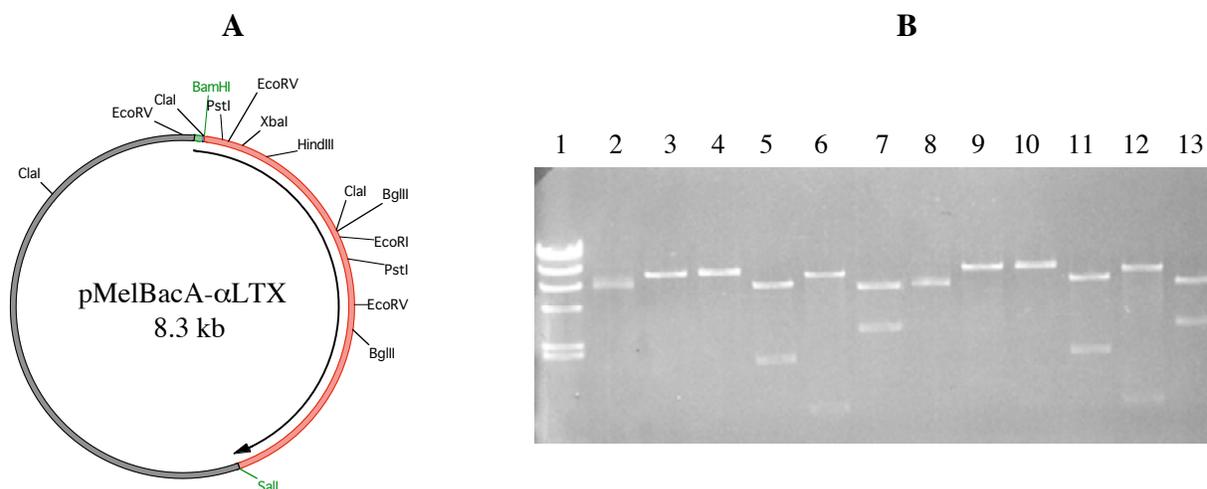


Fig. 13. Clonación del dominio de anquirinas amplificado por PCR con los primers 5'X y enlarge-2 en el vector pMelBacA. A) Construcción *in silico* del vector pMelBacA- α LTX completa. En rojo se muestra el gen de la α LTX fusionado al péptido señal de la melitina (verde).

B) Análisis de restricción del vector pMelBacA- α LTX completa aislado de las colonias 1 y 5. 1) ppM λ Hind III: 23, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0, y 0.56 kb. 2) 1-sin digerir, 3) 1-BamH I, 4) 1-EcoR I, 5) 1-EcoR V, 6) 1-Bgl II, 7) 1-Cla I, 8) 5-sin digerir, 9) 5-BamH I, 10) 5-EcoR I, 11) 5-EcoR V, 12) 5-Bgl II, 13) 5-Cla I.

IV. 3 Clonación del dominio amino- α LTX en pMelBacA

Como objetivo de nuestro trabajo nos propusimos también clonar el dominio amino de la α LTX (α LTX-NT), en el vector pMelBacA y de esta forma expresarlo de manera recombinante utilizando el mismo sistema de baculovirus. Para obtener la construcción pMelBacA- α LTX-NT partimos del vector pMelBacA- α LTX, el cual fue digerido con las enzimas de restricción *EcoR* I y *Sal* I. Luego de rellenar los extremos cohesivos del vector con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*, los 2 fragmentos que resultaron de la digestión fueron separados mediante una electroforesis en gel de agarosa. La banda de interés, que corresponde al fragmento de 6.1kb (pMelBacA- α LTX-NT) fue aislada y autoligada. Posteriormente la ligación se transformó en células de *E. coli* DH5 α . Como resultado de la transformación se obtuvieron más de 100 colonias, seis de las cuales se sembraron medio LB líquido para la extracción del ADN plasmídico. Una digestión preliminar con las enzimas de restricción *BamH* I y *Bgl* II, seguida de una electroforesis en gel de agarosa, arrojó que las clonas 1, 5 y 6 contaban con el inserto del dominio amino de la α LTX en el vector pMelBacA, y nuevamente mostraron una velocidad de crecimiento más lenta que el resto de las colonias analizadas. Un análisis de restricción más detallado de

una de estas 3 clonas con las enzimas de restricción *Cla* I, *Pst* I, *Hind* III, *BstX* I y la combinación *Pst* I/*BstX* I arrojó los resultados esperados luego de separar los productos de la digestión mediante una electroforesis en gel de agarosa (Fig. 14). Esta clona fue también resembrada en 50mL de medio LB líquido y se aisló el ADN plasmídico para su posterior secuenciación.

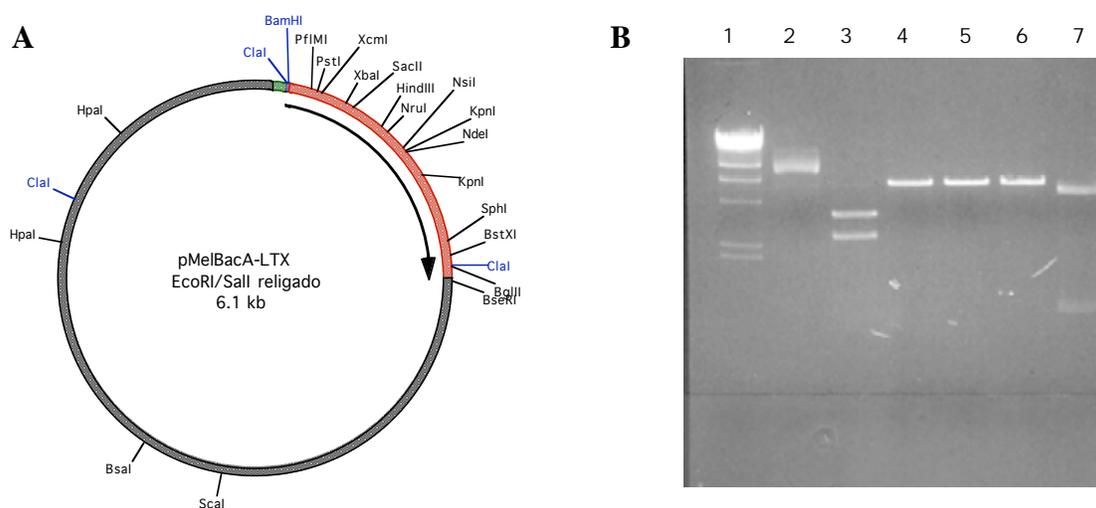


Fig. 14. A) Construcción *in silico* del vector pMelBacA- α LTX-NT. En rojo se muestra el cADN correspondiente al dominio amino de la α LTX. La flecha negra representa la traducción a proteína. B) Análisis de restricción de una de las clonas pMelBacA- α LTX-NT. 1) ppM λ Hind III: 23, 9.4, 6.5, 4.3, 2.3, 2.0, y 0.56 kb, 2) sin digerir, 3) *Cla* I, 4) *Pst* I, 5) *Hind* III, 6) *BstX* I, 7) *Pst* I/*BstX* I.

A continuación se muestra el resultado de la secuenciación de los dominios amino-anquirina de la α LTX fusionados al péptido señal de la melitina dentro del vector pMelBacA. La secuencia coincide perfectamente con el resultado esperado para la α LTX madura.

```

1 ATGAAATTCT TAGTCAACGT TGCCCTTGTT TTTATGGTCG TATACATTTCT
51 TTACATCTAT GCGGATCGAT GGGGATCCGA AGGAGAAGAA TTAACTTTATG
101 ATGAAAAAGC AGAAATATGC TCAGAATTAG AACTCCAACA AAAATATGTA
151 GATATAGCTT CCAATATTAT TGGCGATCTT TCCTCTCTTC CAATGGTTGG
201 TAAAATTGTA GGGACCATAG CTGCAGCCGC GATGACCGTT ACCCATGTTG
251 CTTCTGGGAG GTTAGATATC GAGCAGACGT TGTTGGGTTG CAGTGACTTA
301 CCTTTCGATC AGATTAAGGA AGTTCTGGAA AAGAGGTTCA ACGAAGTAGA
351 CCGGAAGTTG GAAAGTCACA GTGCGGCTCT AGAGGAAATC ACTAAACTGG
401 TAGAGAGAAG TATATCCGCG GTAGAAAAAA CACGGAAGCA GATGAATAAG
451 AGGTTTGATG AAGTCATGAA GTCTATTAG GACGCAAAAG TTTCCCCCAT
501 TGTTTCGAAA ATAAATAACT TTGCAAGATA TTTTGATACT GAAAAGGAAA
551 GAATCCGTGG TTTAAAGTTA AATGATTATA TTCTTAAGCT TGAAGAACCA
601 AATGGCATACTACTTTCATTCAAAGAGTCGCGAACTCCAAAGGATGATAG
651 TTTACAAGCT CTTTATTCA GTATTATTCA AGAAGGATAT GCAGTACCCA
701 AATCAATTGA TGACGAATTA GCTTTTAAAG TTCTCTATGC ATTGCTGTAT
751 GGTACCCAGA CATATGTCTC GGTTATGTTT TTTCTCCTAG AACAACTCTC
801 TTTCTGGCT AACCATTTATTACGAGAAAGGAGATTTAGAA AAGTATGATG
851 AATACTTTAA TAACCTTAAT AATGTATTTT TAGATTTCAA ATCATCACTT
901 GTGGGTACCG GCACATCTAA TAACGAAGGT CTTATTGACA GAGTGTTCA
951 AGTTTTAATG ACTGTTAAGA ATAGCGAGTT CTTAGGAATT GGAAAAAACG
1001 GTGTAGATGA AATGCTGAAC GAGAAAAATA ATTTATTTAA TAAAATTAAG
1051 GAAGAAATCG AAAGCAAGCA GAGAATGACA ATAAGTGAGA CACCAGAAAA
1101 TTTTGCSCAA ATTTCTTTG ACAAAGATAT AACAACTCCC ATCGGAGATT
1151 GGAGAGATGG TCGGGAAGTA CGTTACGCTG TACAATATGC AAGTGAAACC
1201 TTATTTTCTA AAATCGGTCA TTGGTCTGAT CCCTTGAGTG TAAGAGAGAA
1251 AGCATGCCCT ACTCTCAGAA TGCCAGTTGA CCAAACCCGA AGAAACGTAC
1301 TTGTTTTAG AAAATTTGAC AACAGCAAAC CCCAACTGGT TGGCGAAATC
1351 ACACCATACT TATCAAATTT CATTGACATC GATAGAGATC TTTATAATGC
1401 CGCTAGTAAT CCTGATTGAG CTGTAGGTTT TAAGGAATTC ACGAAATTA
1451 ACTATGTTGG TGCTAATATT AGAGCAACTT TCGATCAAGG AAGAACAGTT
1501 TTTCTAGCCG CAGCAAAAAG TGGTAACGAC AAGATTATGT TTGGATTAAC
1551 GTTCTTAGTA AAGTCTACTG AATTAACAAC ACCAGATAAA AAGGGTTACA
1601 CTCCTATTCA TGTAGCTGCA GATAGTGGAA ACGCTGGTAT TGTTAATCTC
1651 TTGATACAAA GAGGTGTATC TATAAATTCA AAAACATACC ATTTCTTCA
1701 AACACCACTG CACTTGGCTG CTCAGCGCGG ATTTGTAAAT ACTTTTCAA
1751 GATTAATGGA GAGTCTGAA ATAAATATA ATGAAAGAGA TAAAGATGGA
1801 TTCACGCCGC TACATTATGC TGTTCCGGGC GGTGAAAGAA TTTTGGAGGC
1851 ATTCATGAAC CAAATCAGTA TTGATGTAAG TGCCAAGTCT AATAAGGGCT
1901 TAACCTCTTT CCATCTGGCA ATCATTAAAG ACGATTGGCC AGTAGCCAGT
1951 ACTTTATTGA GAAGCAAGAA GGTTGATATC AATGCAGTCG ATGAAAAACA
2001 CATGACAGCT TTGCACTATG CAGCGATTTT GGGATACTTA GAAACTACAA
2051 AACCAATTGAT AAACCTGAAA GAAATAAATG CGAATGTAGT ATCTTCTCCT
2101 GGCCTATTGT CCGCCTTACA CTATGCGATT CTCTATAAGC ATGATGATGT
2151 GGCCTCGTTT TTGTTGAGAT CTTCAAATGT CAATGTAAAC TTGAAAGCTC
2201 TCGGGGGTAT CACCCCCTC CACCTTGCCG TGATGCAAGG AAGAAAAACA
2251 GTTCTTTCGT TGATGTTTAA TATAGGTGTG AATATAGAAC AGCAGACAGA
2301 TGAAAAATAT ACGCCCCTTC ATCTCGCGGC AATGAGCAAG TATCTGAGC
2351 TTATTCAAAT ATTGCTAGAT CAAGATTGCA ATTTGAGGC AAAACAAT
2401 TCTGGTGCAA CACCATTCA TTTGGCCACA TTTAAGGGTA AATCACAAGC
2451 AGCTCTCATT TTATTGAATA ATGAAGAGAA CTGGAGAGAC ACAGATGAAA
2501 ATGGTCAAAT GCCTATTCAT GGAGCTGCAA CGACTGGACT GCTGGATGTT
2551 GCTCAAGCTA TTATTAGCAT AGATGCCACT GTTCTTGATA TAGAAGATAA
2601 AAATCCGAC ACTCCCCTTA ACTTAGCGGC GCAAAATTCT CACATAGATA
2651 CAGTAAAAATA CTTTATAGAC CAAGGAGCTG ATATTAATAC AAGAAATAAA
2701 AATGGCCATG CTCCGTTGCT TGCCTTTTCC AAGAAGGGAA ATTTGGATAT
2751 GGTCAAGTAT CTTTTTGACA AGAATGCTAA TGTTTATATC GCTGACAATA
2801 ATGGTATGAA TTTTTTTTAC TATGCAGTTC GAAATGGTCA TTTGAATATA
2851 ATTAATACG CTATGTCAGA AAAAGATAAG TTTGAATGGA GTAATATAGA
2901 TAATAATAGA AGGGATGAAT GCCCTAAAGA AGAATGTGCA ATCTCTCATT
2951 TTGCAGTTTG CGATGCAGTT CAATTTGATA AAATAGAAAT AGTAAAAATC
3001 TTTGTTGGTA CTCTTGAAAA TTTTAGCATT TGTGGTCCCT TGCATCAAGC
3051 AGCACGGTAC GGTCACTTTC ACATAGTGAA ATATTTGGTC GAAGAAGAA
3101 ATCTCAGTGT TGACGGAAGC AAAACTGATA CTCCATTGTG TTACGCTTCT
3151 GAAAATGGAC ATTTAGCGGT TGTTCAACAT CTAGTAAGTA ATGGGGCAA
3201 AGTTAATCAT GATTGTGATA ATGGTATGAC AGCTATAGAC AAAGCTATAA
3251 CAAAAAACA TTTACAAGTG GTACAGTTTT TAGCTGCAA TGGAGTTGAC
3301 TTCCGTCGTA AAAAATAGTC TGTTGCTACT CTTTTTCTCA CGGAGTGGC
3351 TGAAAATGTC TTTGATATTG CAGAATACCT TATTCTGTAG AAAAGACAGG
3401 ATATTAATAT AAACGAGCAA AATGTAGATA AAGACACTGC CTTACATTTA
3451 GCCGTTTATT ATAAAAACTT ACAGATGATA AAACTTTTAG TAAAATATGG
3501 AATAGACGTG ACTATCAGAA ATGCTTATGA TAAAACAGCT TTGGATTTG
3551 CCACAGATGC CAAATTTTCC AACATCGTCA AATATTTGAA AACAAACAGC
3601 GGAAAATTCC GGAGGTAA

```

IV.4 Obtención y análisis de los baculovirus recombinantes

IV.4.1 Generación de los baculovirus recombinantes

Luego de realizar la cotransfección de células de insecto Sf9 con las construcciones pMelBacA- α LTX completa o pMelBacA- α LTX-NT junto con el ADN de baculovirus *Bac-N-Blue*, colectamos el sobrenadante de cultivo y lo guardamos a 4°C. Para detectar los virus recombinantes, realizamos dos ensayos en placa utilizando el sobrenadante de cultivo de ambas cotransfecciones: células Sf9 fueron infectadas con los sobrenadantes de las cotransfecciones virales a diferentes diluciones y se incubaron en medio de cultivo con agarosa y con el sustrato cromogénico X-gal. A partir de este experimento aislamos 11 placas virales azules como resultado de la infección de las células Sf9 con el sobrenadante de la cotransfección con el vector pMelBacA- α LTX completa y 1 placa viral azul a partir de la infección con el sobrenadante de la cotransfección con el vector pMelBacA- α LTX-NT. Las células infectadas son de color azul debido a la hidrólisis del sustrato X-gal por la enzima β -galactosidasa, la cual se expresa en las células infectadas por los baculovirus recombinantes, que además tienen un diámetro mayor y superficie más irregular que las células no infectadas (Fig. 15). Las placas virales aisladas fueron resuspendidas en medio Sf900-II y se reamplificaron 2 veces. Los sobrenadantes de la segunda amplificación viral fueron recolectados y almacenados para posteriores estudios.

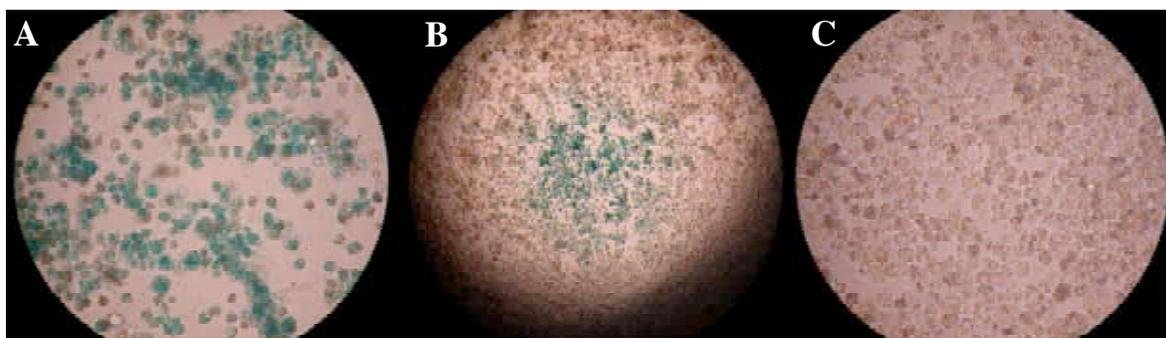


Fig. 15. (A) Células Sf9 infectadas con los baculovirus recombinantes que codifican para la α LTX completa, observadas con un aumento de 40X. (B) Placa viral observada con un aumento de 10X. (C) Células Sf9 no infectadas.

IV.4.2 Identificación del gen de α LTX en el genoma viral

Para detectar la presencia del gen de α LTX completa y α LTX amino en el genoma viral, aislamos el ADN de los virus colectados del sobrenadante de la segunda amplificación viral de 5 placas virales (4 de α LTX completa y la única obtenida de α LTX amino) y realizamos ensayos de PCR. Para esto utilizamos *primers* que hibridan en los extremos del gen de la poliedrina así como un *primer* que hibrida en el extremo 3' del dominio amino del gen de la α LTX. Como resultado de estos ensayos pudimos detectar que las 4 clonas virales procedentes de la cotransfección con pMelBacA- α LTX completa tienen insertado el cADN codificante de los dominios amino-anquirina de la α LTX fusionado al péptido señal de la melitina (fragmento de 3.8kb). Además, la única clona proveniente de la cotransfección con pMelBacA- α LTX amino también cuenta con el fragmento correspondiente al dominio amino insertado en el genoma viral (fragmento de 1.6kb). En todos los ensayos de PCR se utilizó la construcción pMelBacA- α LTX completa como control positivo (Fig. 16).

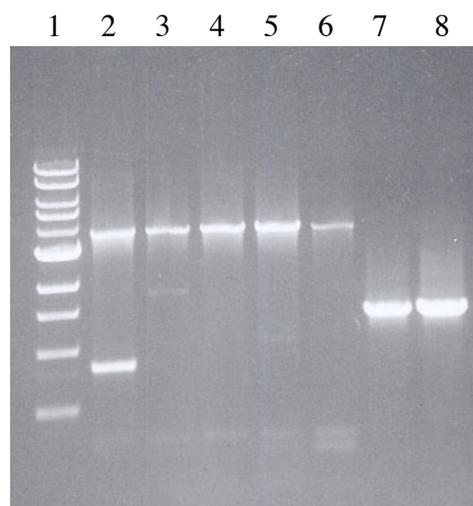


Fig. 16. Gel de agarosa donde se observan los productos de PCR amplificados a partir del ADN de 4 placas virales recombinantes que contienen insertado el gen de la α LTX completa así como de la única placa viral que cuenta con el dominio amino de esta proteína.

- 1: ppM λ Ladder: 10, 8, 6, 5, 4, 3, 2, 1.5 y 0.5 kb.
- 2: clona4_FwdPolh + RevPolh
- 3: clona5_FwdPolh + RevPolh
- 4: clona7_FwdPolh + RevPolh
- 5: clona8_FwdPolh + RevPolh
- 6: PMelBacA-LTXcompleta_FwdPolh + RevPolh
- 7: ClonaNH₂_FwdPolh + 3'VI
- 8: PMelBacA-LTXcompleta FwdPolh + 3'VI

Tomando en cuenta estos resultados, decidimos estudiar la expresión de la α LTX completa a partir de la infección de células de insecto H5 con la placa viral 7, debido a que a partir del ADN de estos virus se obtiene un único producto de PCR del tamaño deseado. También estudiamos la expresión del dominio amino de la α LTX. Para esto, realizamos la titulación del sobrenadante de cultivo de la segunda amplificación viral tanto de la clona viral 7 que

contiene el cADN de los dominios amino-anquirina completo de la α LTX como de la clona viral que contiene sólo el dominio amino de dicha proteína. Los resultados fueron los siguientes:

SN 2da amplificación	pfu/mL
Clona 7	$6 \cdot 10^8$
Clona NH ₂	$2.5 \cdot 10^8$

IV. 5 Expresión y purificación de la α LTX recombinante

Primeramente realizamos un estudio de la expresión de la α LTX. Para ello sembramos 3 matraces con células de insecto H5 en medio de cultivo SF900-II ($1 \cdot 10^6$ células/mL) y se infectaron con el sobrenadante de cultivo de la segunda amplificación viral de la clona 7 a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 virus por célula. El sobrenadante de cultivo fue recolectado a las 24, 48 y 72h post-infección y la presencia de α LTX recombinante se detectó mediante experimentos de SDS-PAGE y *Western Blot*, donde se utilizó un suero de conejo inmunizado con el dominio amino de la α LTX como primer anticuerpo y un conjugado de borrego anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina como segundo anticuerpo. En este ensayo también estudiamos la expresión del dominio amino de la α LTX a partir del sobrenadante de 72h postinfección de células H5 infectadas con el sobrenadante de cultivo de la segunda amplificación viral de la clona α LTX amino a una MOI de 5. Se utilizó como control positivo del experimento veneno de *L. mactans* y como control negativo sobrenadante de células H5 sin infectar. Como se observa en la figura 17, a las 48h se alcanza el máximo de expresión de la α LTX recombinante. También se detectó la presencia del dominio amino de la α LTX. En un ensayo preliminar de toxicidad, 4 ratones CD1 entre 18 y 20g de peso, fueron inoculados por vía intravenosa con 500 μ L de los sobrenadantes colectados en este experimento (24, 48 y 72h postinfección y un ratón con sobrenadante de células H5 sin infectar). Todos los ratones inyectados con sobrenadante de infección mostraron síntomas de envenenamiento: ojos cerrados, ataxia, pelo erizado y dolor, entre otros. Los más envenenados fueron los ratones inyectados con el sobrenadante de 48 y 72h postinfección, falleciendo este último en menos de un día.

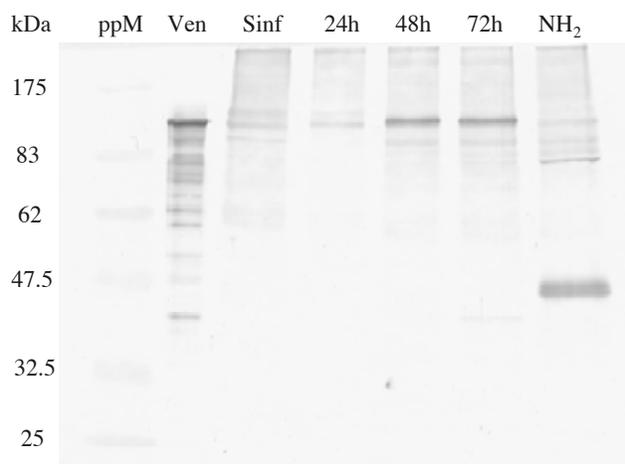


Fig.17. Expresión de α LTX recombinante. Los sobrenadantes colectados 24, 48 y 72h post-infección fueron analizados mediante SDS-PAGE y *Western Blot*, junto al veneno de *L. mactans* (Ven) y al sobrenadante de células H5 sin infectar (Sinf). También evaluamos la expresión del dominio amino de la α LTX en células H5 infectadas durante 72h con los virus recombinantes (NH₂). Como primer anticuerpo se utilizó un suero de conejo anti-dominio amino de α LTX y como segundo anticuerpo, un conjugado anti-conejo acoplado a fosfatasa alcalina

IV.5.1 Cinética de expresión de α LTX recombinante

Para determinar en qué momento se alcanzaba el máximo de expresión de α LTX recombinante, se probaron dos estrategias diferentes donde variamos el tiempo de infección y la multiplicidad de infección. Por una parte, se sembraron 4 matraces con células de insecto H5 en medio de cultivo SF900-II a razón de 1×10^6 células/mL. Las células fueron infectadas con el baculovirus recombinante a una MOI de 5 pfu/célula. Como segunda variante, se sembraron 4 matraces con células H5 a una densidad de 0.5×10^6 células/mL y se infectaron a una MOI de 0.1 pfu/célula. El sobrenadante de cultivo fue recolectado a las 24, 48, 72 y 96h post-infección y se determinó la densidad y viabilidad celular (Fig. 18A) así como la presencia de α LTX recombinante mediante SDS-PAGE y *Western Blot* (Fig. 18B). En el caso de las células infectadas a una MOI=0.1 pfu/célula y a una densidad inicial de 0.5×10^6 células/mL, el máximo de expresión de α LTX se alcanza a las 72h post-infección. Para las células infectadas a una densidad inicial de 1×10^6 células/mL y a una MOI de 5 pfu/célula, el máximo de producción de α LTX se observa a las 48h post-infección. El resultado de densidad y viabilidad celular para las 96h post-infección no se muestra para ninguna de las estrategias analizadas pues las células se encontraban en muy mal estado: casi todas muertas o lisadas, resultado que concuerda con el hecho de que no se observa α LTX recombinante en este momento, lo cual puede deberse a la acción de proteasas presentes en las células H5 y que son liberadas al exterior al producirse la lisis celular.

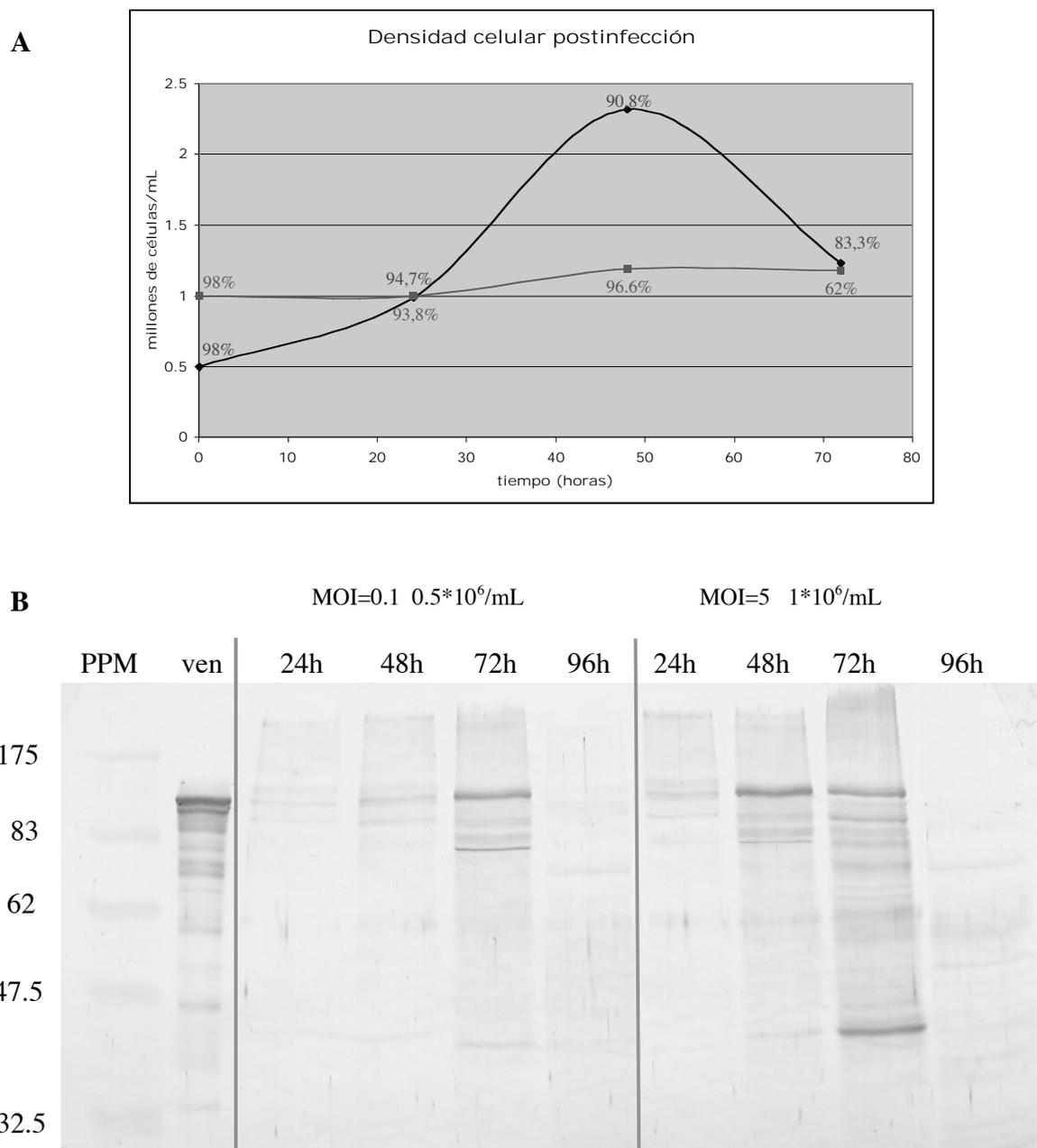


Fig.18. Cinética de expresión de α LTX recombinante. A) Representación de la densidad y viabilidad celular para ambas estrategias de infección. En negro se muestran las células de insecto H5 infectadas a una densidad inicial de $0.5 \cdot 10^6$ células/mL y en gris, las células infectadas a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6$ células/mL. B) Expresión de α LTX recombinante medida por ensayos de *Western Blot*. Como primer anticuerpo se utilizó un suero de conejo anti- α LTX amino y como segundo anticuerpo se utilizó un conjugado anti-IgGs de conejo acoplado a fosfatasa alcalina.

IV.5.2 Purificación de α LTX recombinante

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 1×10^6 células/mL e infectarlas con los virus recombinantes a una la MOI de 5 pfu/célula, o sembrarlas a una densidad de 0.5×10^6 células/mL e infectarlas a una MOI de 0.1 pfu/célula. Los sobrenadantes de cultivo obtenidos de esta forma, se colectaron 48 y 72h postinfección, respectivamente. La purificación de la α LTX se realizó siguiendo el protocolo de Volynski et al (1999) con algunas modificaciones, partiendo de 30mL del sobrenadante de cultivo. Un primer paso en la purificación consistió en pasar el sobrenadante de cultivo por un filtro Q15 de intercambio aniónico. La fracción eluida del filtro con 1M de NaCl fue sometida a una cromatografía FPLC a través de una columna MonoQ. La elución se realizó con un gradiente lineal de NaCl desde 0.1M hasta 0.5M. La α LTX eluyó entre 0.29 y 0.35M de NaCl.

El sobrenadante de cultivo, el eluato del filtro Q15 y las fracciones de la cromatografía fueron colectadas y analizadas por SDS-PAGE. La detección de la α LTX recombinante se realizó mediante ensayos de *Western Blot* utilizando un suero de conejo inmunizado con el dominio amino de la α LTX (Fig. 19). Como resultado de la purificación, obtuvimos 5 fracciones positivas para α LTX (fracciones 12-16), las cuales, al ser analizadas por SDS-PAGE, mostraron que junto a la α -latrotoxina, eluyen una gran variedad de proteínas, entre ellas una de peso molecular muy similar a ésta y que representa la banda mayoritaria de muchas de las fracciones analizadas. La concentración de proteína total de las fracciones 12-16 fluctuó entre los 85 y 110 μ g/mL.

Para determinar si las propiedades fisiológicas de la α LTX recombinante se mantenían luego de la purificación, se juntaron las fracciones 12-16 y se inyectaron por vía intravenosa a 3 grupos de 3 ratones CD1 (18-20g) cada uno con 20, 30 y 50 μ g de proteína total. A las 24h post inyección, los ratones inyectados con 20 μ g de proteína se recuperaron, pero los de 30 y 50 μ g evidenciaban síntomas de envenenamiento severo. Uno de los ratones inyectados con 50 μ g murió. A las 48h post inyección, todos los ratones del grupo de 50 μ g estaban muertos, así como 2 ratones del grupo de 30 μ g. A las 72h, decidimos dar muerte al ratón que quedaba vivo inyectado con 30 μ g pues apenas podía moverse ni respirar, y se encontraba hipotérmico. Como resultado de este experimento, comprobamos

que la α LTX recombinante mantiene sus propiedades biológicas a lo largo del proceso de purificación, y nos da una idea de la cantidad de proteína que tenemos en las fracciones finales.

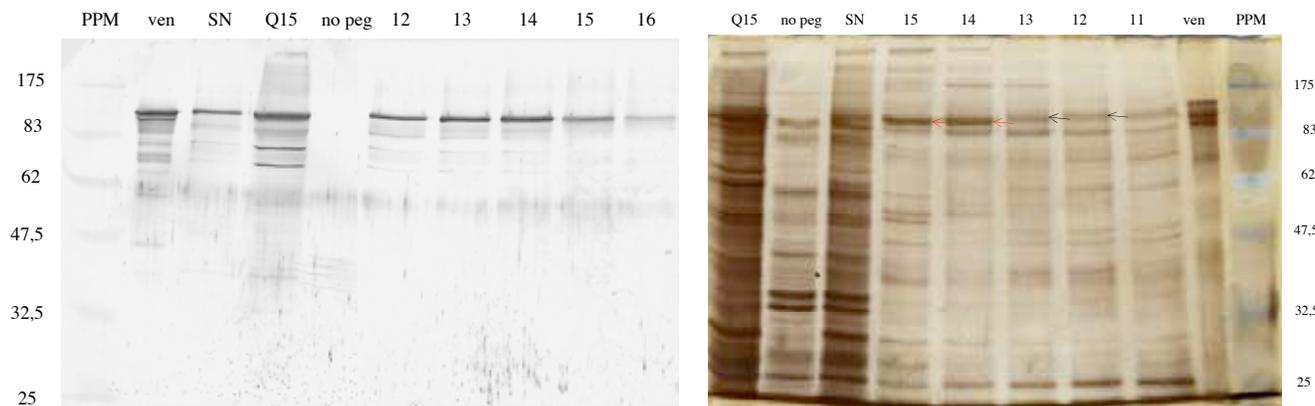


Fig.19. Purificación de α LTX recombinante. Las fracciones obtenidas luego de la elución de la columna de MonoQ, fueron analizadas por *Western Blot* para detectar la presencia de α LTX. Las fracciones positivas para α LTX (12-16) fueron separadas por SDS-PAGE y las proteínas se visualizaron por tinción con nitrato de plata. 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). Las flechas negras muestran la banda correspondiente a la α LTX, y las rojas muestran una proteína de peso molecular similar.

Si tenemos en cuenta que la DL_{100} de la α LTX recombinante de *L. tredecimguttatus* es 3 μ g/ratón (Volynski et al., 1999), entonces en una fracción de 30 μ g de proteína total, el 10% es α LTX recombinante. Como vemos, el porcentaje de pureza final de la α LTX utilizando este protocolo de purificación es bajo.

Por tal motivo, nos dimos a la tarea de variar algunas de las condiciones del protocolo de purificación del grupo de Volynski et al (1999) con el objetivo de aumentar el grado de pureza de la α LTX. Lo primero que hicimos fue optimizar la cantidad de proteína adherida al filtro Q15. Para ello el sobrenadante de cultivo de células H5 infectadas con los baculovirus recombinantes se pasó 4 veces por el filtro antes de la elución con la solución de Tris-HCl 25mM, 1M NaCl. Como resultado de este ensayo, determinamos que con dos pases del mismo sobrenadante por el filtro Q15 era suficiente para que toda la α LTX presente en el sobrenadante de cultivo se adhiriera al filtro (datos no mostrados).

Posteriormente, decidimos disminuir el pH de la solución de trabajo para minimizar el número de proteínas con carga neta negativa capaces de interactuar con el filtro Q15 y la columna MonoQ. Para lograr este objetivo, realizamos un ensayo de adhesión de la α LTX a una matriz de Q-Sepharosa, la cual presenta el mismo tipo de grupo intercambiador que el filtro Q15 y la columna MonoQ. En este ensayo, la matriz fue equilibrada con soluciones tampones a diferentes pHs (6, 6.5, 7, 7.5, 8 y 8.5) y luego se incubó durante 30min con una solución de α LTX. Luego de un tiempo para permitir el asentamiento de la matriz, se analizó el sobrenadante por SDS-PAGE y *Western Blot* para detectar la desaparición de la α LTX en función de su grado de interacción con la matriz. Como resultado, a todos los pHs analizados observamos que toda la α LTX presente en la solución inicial fue capaz de interaccionar con la matriz de Q-Sepharosa, por lo que decidimos retomar la purificación de la proteína recombinante con una solución de 20mM L-histidina a pH 6 (Fig.20).

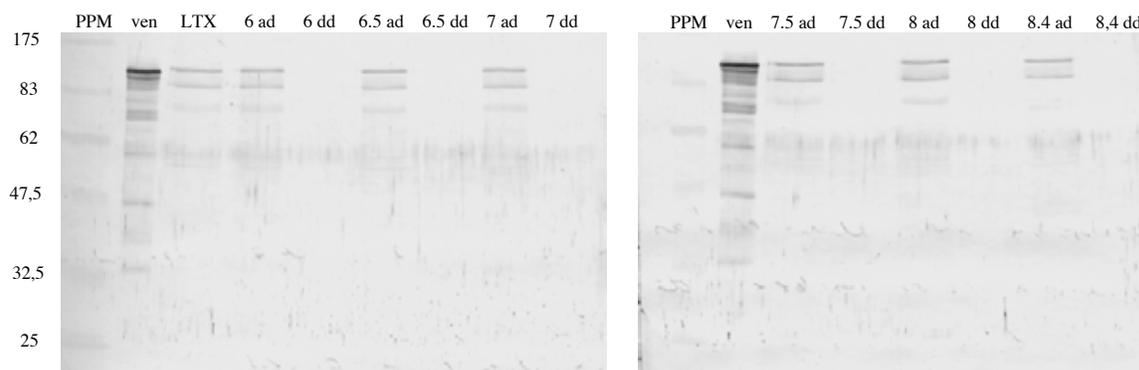


Fig. 20. Ensayo de adhesión para determinar el pH de trabajo. La solución de α LTX fue incubada con una matriz de Q-Sepharosa a diferentes pHs y, mediante SDS-PAGE y *Western Blot*, se analizó su desaparición de la solución inicial. En los carriles se muestra la solución de α LTX antes (ad) y después (dd) de interaccionar con la matriz a los diferentes pHs analizados. Como control positivo del *Western Blot* utilizamos veneno de *L. mactans*.

Seguidamente, probamos minimizar la cantidad de proteína eluida del filtro Q15 disminuyendo la fuerza iónica de la solución de elución. Para ello, nos basamos en el resultado obtenido en la cromatografía de intercambio aniónico, donde la α LTX eluye a molaridades de NaCl entre 0.25 y 0.35M. De esta forma, decidimos analizar la elución de las proteínas del filtro Q15 con una solución de Tris-HCl 25mM a 0.5M NaCl en una

primera etapa, y luego con la misma solución en 1M NaCl. En la figura 21A se muestran los resultados de este experimento analizados por *Western Blot*, donde se observa que prácticamente toda la α LTX adherida al filtro Q15 eluye a una molaridad de NaCl de 0.5M. El análisis de estas fracciones por SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata, muestra la gran cantidad de proteínas que son aún retenidas en el filtro luego del primer paso de elución con la solución de L-His 20mM y 0.5M de NaCl, las cuales posteriormente eluyen con la misma solución tampón a 1M NaCl (Fig. 21 B).

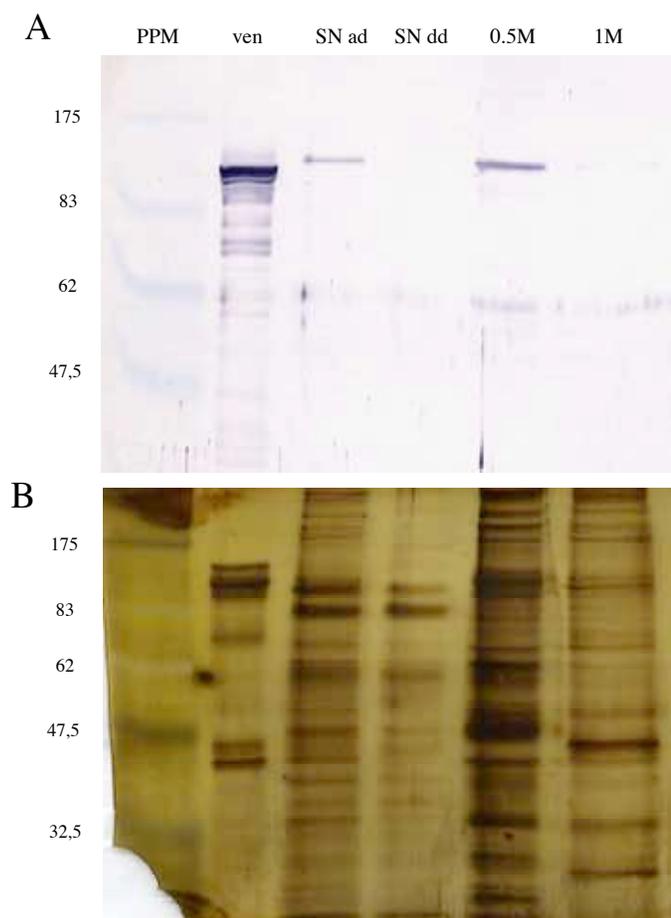


Fig.21. Ensayo de optimización de la molaridad de la solución para eluir la α LTX del filtro Q15. El sobrenadante de cultivo diluído 1:2 con una solución tampón de L-histidina 20 mM, fue pasado dos veces por el filtro Q15, y las proteínas adheridas se eluyeron en serie con la misma solución tampón a una molaridad de NaCl de 0.5M y 1M. El sobrenadante de cultivo antes (SN ad) y después de ser pasado por el filtro (SN dd), así como las fracciones eluidas, fueron analizados por SDS-PAGE y *Western Blot* (A). La cantidad total de proteína de cada fracción se determinó por SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata (B). Como control positivo de los experimentos se utilizó veneno de *L. mactans*.

Con este nuevo pH de trabajo, realizamos otro proceso de purificación. Células H5 se sembraron a una densidad de 0.5×10^6 /mL y se infectaron a una MOI de 0.1. 160mL de sobrenadante fueron colectados 72h más tarde y se diluyeron 1/2 con la solución tampón de L-histidina 20mM pH6. Esta solución se pasó por el filtro Q15 y las proteínas adheridas al

filtro se eluyeron con 15mL de la misma solución y 0.5M NaCl. Posteriormente, la proteína eluida del filtro fue dializada contra una solución de L-His 20mM para eliminar el NaCl y se purificó por FPLC utilizando la columna MonoQ. En este caso, la α LTX se eluyó de la columna con un gradiente de NaCl de 0 a 0.5M. Las fracciones colectadas fueron analizadas por SDS-PAGE y *Western Blot* para detectar la presencia de la α LTX utilizando un suero de conejo específico por el dominio amino de la α LTX. Al analizar la composición total de proteína de estas fracciones por SDS-PAGE y tinción con nitrato de plata, observamos todavía una gran cantidad de proteínas contaminantes (Fig. 22). Al juntar estas fracciones, nos quedamos con 7.5 mL totales a una concentración de proteína de 0.4 mg/mL.

Hasta este punto, podemos ver que aunque se eliminaron muchos contaminantes al cambiar el pH de trabajo, como son la proteína de alto peso molecular que co-eluía junto a la α LTX al purificarla por la columna de MonoQ a pH 8.2, todavía no hemos logrado aumentar la pureza de las fracciones obtenidas. En estas nuevas condiciones de trabajo se presentan otros contaminantes de bajo peso molecular, los cuales se señalan en un recuadro en la Fig.22.

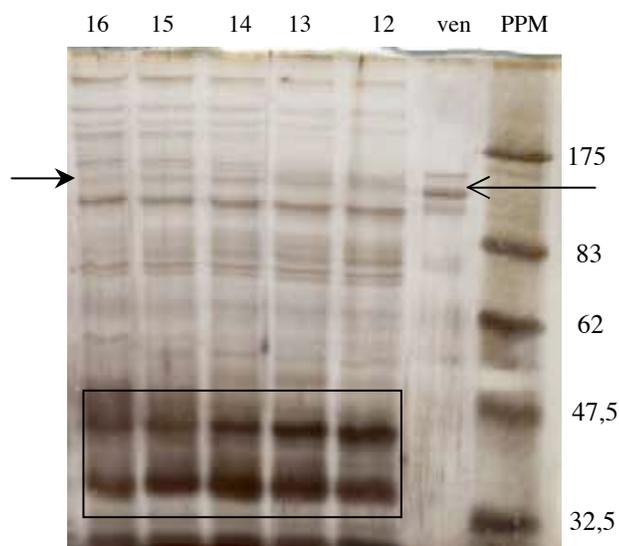


Fig.22. Nueva purificación de α LTX recombinante. Las fracciones resultantes de la purificación por MonoQ fueron analizadas por *Western Blot* para detectar la presencia de α LTX recombinante. Las fracciones positivas para α LTX (12-16) fueron separadas por SDS-PAGE y las proteínas se visualizaron por tinción con nitrato de plata. Como control positivo de los experimentos se utilizó el veneno de *L. mactans*. Las flechas negras muestran la banda correspondiente a la α LTX, tanto en el veneno como en las fracciones obtenidas de la cromatografía.

IV.6 Evaluación de la respuesta inmune humoral generada en conejos inmunizados con la α LTX recombinante

Se inmunizaron dos conejos con el sobrenadante de cultivo de células H5 infectadas con los baculovirus recombinantes y con la toxina purificada por FPLC. Mediante un ensayo de ELISA, medimos el reconocimiento del veneno de *L. mactans* por los sueros pre y postinmunes de estos animales utilizando inmunoglobulinas de cabra específicas por IgG de conejo acopladas a fosfatasa alcalina. Como se muestra en la figura 23, los sueros postinmunes de ambos conejos son capaces de reconocer al veneno de *L. mactans*, destacándose en este aspecto, el suero proveniente del conejo 27.

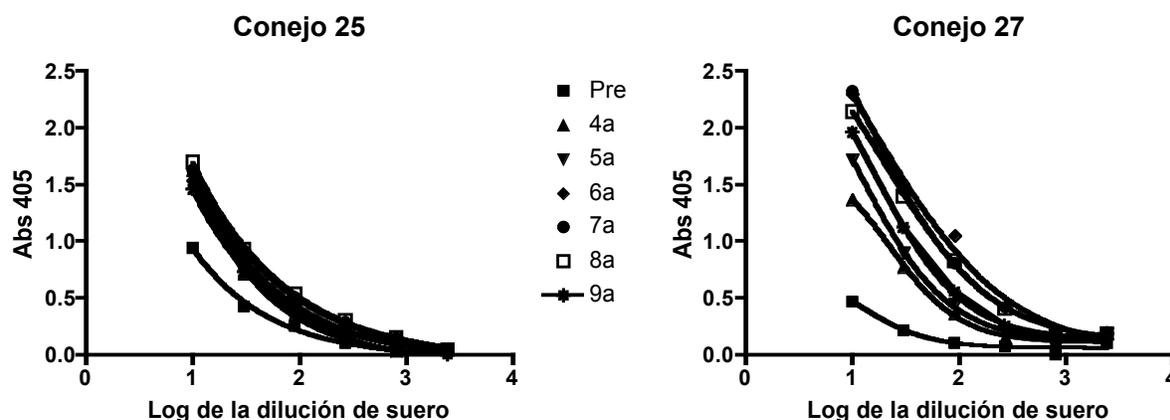


Fig.23. Reconocimiento del veneno de *L. mactans* por el suero de conejos inmunizados con la α LTX recombinante. Dos conejos de la cepa NZW recibieron 12 dosis de 100 μ g del sobrenadante de cultivo de células H5 infectadas con los baculovirus recombinantes y posteriormente fueron inmunizados con α LTX 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.

V. Discusión

El principal objetivo de mi trabajo fue obtener de forma recombinante y activa a la α -latrotoxina, proteína del veneno de la araña viuda negra 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-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 terminal 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.

Tomando en consideración que 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, decidimos utilizar este mismo sistema para expresar la α LTX recombinante de *L. mactans*. Para lograr este objetivo partimos de un plásmido obtenido en nuestro laboratorio que tenía insertada la secuencia codificante de los dominios amino y anquirinas de la α LTX. A partir de esta construcción, denominada pCR2.1 TOPO- α LTX, subclonamos el cADN que codifica para los dominios amino-anquirinas de la α LTX en el vector pMelBacA, con el objetivo de cotransfectarlo a células de insecto junto con ADN de baculovirus. De esta forma, mediante un proceso de recombinación homóloga, se obtuvieron baculovirus recombinantes que tenían insertado en su genoma el cADN codificante para los dominios amino-anquirinas de la α LTX.

La generación de construcciones con el cADN de la α LTX insertado en el vector pMelBacA 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. Aunque las colonias resultantes eran resistentes al antibiótico, no

presentaban ADN plasmídico de la masa molecular esperada y mostraron patrones de restricción incompatibles con las secuencias utilizadas en la ligación. No fue hasta utilizar las células *XL2 Blue* ultracompetentes que logramos obtener la construcción deseada. 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. De igual forma, la eficiencia de la ligación y/o transformación del gen de la α LTX en el vector pMelBacA fue baja y es de destacar también, que todas las construcciones donde se insertó el gen de la α LTX de forma correcta así como el dominio amino de este gen, disminuyeron el crecimiento de las colonias bacterianas donde fueron transformadas. Una vez obtenida la construcción pMelBacA- α LTX, esta fue analizada por secuenciación y pudimos constatar que la secuencia del gen de la α LTX fue idéntica a la reportada por Prud’Homme (2004).

Otro fenómeno que observamos al analizar la secuencia del gen de la α LTX es que hay determinados sitios de restricción que, aunque existentes, no están expuestos para la acción de determinadas enzimas, como es el caso de *Cla* I. Esta enzima de restricción tiene 3 sitios de corte (por secuencia) en el vector pMelBacA- α LTX, y sin embargo, el resultado de esta digestión arroja sólo 2 bandas de ADN visualizadas en un gel de agarosa. Resulta interesante también que el fragmento del gen de la α LTX amplificado por PCR con los *primers* 5’X y enlarge-1 para elongar el dominio de anquirinas, no pudo ser reamplificado directamente por PCR con los *primers* 5’X y enlarge-2. El resultado del primer PCR tuvo que ser clonado en el vector de secuenciación pCR2.1 TOPO para entonces proceder a su reamplificación. Este fenómeno también fue observado por Prud’Homme (2004) en los primeros trabajos de caracterización del cADN de la α LTX.

Desde el año 1983, el sistema de células de insecto-baculovirus se ha convertido en uno de los sistemas de expresión eucarióticos de proteínas recombinantes más versátiles y poderosos (Smith et al., 1983). Mediante el uso de este sistema se han expresado miles de proteínas recombinantes, entre las que se encuentran la proteína cinasa C y el receptor del factor de crecimiento epidérmico (Patel et al., 1988), así como las proteínas de cápside de rotavirus humano VP6 y VP2 (Mena et al., 2006), entre otras. El uso de este sistema de

expresión tiene numerosas ventajas: no son patogénicos para plantas ni mamíferos (Ignoffo, 1975) y la manipulación de células de insecto no requiere cuidados especiales ya que no son transformadas por virus patogénicos o infecciosos y crecen fácilmente en cultivos en suspensión, facilitando así la producción de grandes cantidades de proteínas recombinantes. Mediante la utilización de este sistema, se ha reportado la expresión de varias proteínas simultáneamente utilizando el mismo baculovirus, con rendimientos de hasta 1g de proteína por 10^9 células infectadas (Gruenwald y Heitz, 1993).

Para la obtención de los baculovirus recombinantes, los vectores pMelBacA- α LTX y pMelBacA- α LTX-NT fueron cotransfectados junto con ADN baculoviral *Bac-N-Blue* en células de insecto Sf9. Una vez obtenidos los baculovirus recombinantes, el ADN de diferentes clonas virales fue purificado y analizado para confirmar la inserción correcta del gen de la α LTX en el genoma viral. Para ello realizamos experimentos de PCR donde amplificamos el cADN completo de la α LTX fusionado al péptido señal de la melitina. Es de destacar que esta es la primera vez que el cADN completo de la α LTX de *L. mactans* es amplificado por PCR, y esto puede deberse, entre otras razones, a que la secuencia del péptido señal de la melitina que se encuentra en el extremo 5' del gen interfiera con la formación de estructuras secundarias y, de esta forma, se haya facilitado la hibridación/elongación de los *primers*. El cADN de la α LTX fue clonado en el vector de secuenciación pCR2.1TOPO, y el análisis de su secuencia permitió constatar que el gen de la α LTX amplificado a partir del genoma viral se encuentra en el marco de lectura correcto y en fase con el péptido señal de la melitina, por lo que, a nivel de secuencia, no existe ningún impedimento para una correcta expresión de la proteína recombinante.

La titulación de los sobrenadantes de cultivo de la segunda amplificación de las clonas virales que contienen los dominios amino-anquirinas y el dominio amino de la α LTX dio como resultado valores de $6 \cdot 10^8$ y $2.5 \cdot 10^8$ unidades formadoras de placas por mL de sobrenadante de cultivo, respectivamente, valores que entran dentro del rango esperado ($>10^7$ pfu/mL) para la formación de partículas virales infecciosas.

Para optimizar la expresión de la proteína recombinante utilizamos la línea celular de insecto H5, ya que se ha reportado que expresa niveles más altos de proteínas recombinantes que otras líneas celulares de insecto como Sf9 o Sf21. Las células H5 producen 20 veces más proteína que las células Sf9 y 23 veces más que las células Sf21 en cultivos celulares en suspensión (Davis et al., 1993; Rhiel et al., 1997). Uno de los principales logros de este trabajo fue expresar la α LTX recombinante de *L. mactans* completa, soluble y activa, resultado que no pudo ser obtenido al utilizar células de *E. coli* como sistema de expresión (Prud'Homme, 2004).

Para purificar la α LTX recombinante, lo primero que realizamos fue 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 la distribución de Poisson (Palomares, 1999). Primeramente decidimos infectar las células a una multiplicidad de 5 pfu/célula para garantizar que el 99% de las células estuvieran infectadas con al menos un baculovirus. Según los resultados obtenidos por Volynski et al. (1999) la MOI reportada como óptima para la expresión de α LTX recombinante es de 10 pfu/célula y el tiempo óptimo de colecta del sobrenadante de cultivo es de 96 horas postinfección. Sin embargo, en nuestras condiciones de trabajo observamos que a las 48 horas se expresó la mayor cantidad de α LTX recombinante activa al infectar células H5 a una densidad inicial de 1×10^6 /mL y MOI=5 pfu/célula. Este resultado se corresponde con otros reportes sobre expresión de proteínas de alto peso molecular, donde se señala que alcanzan máximos niveles de expresión en etapas más tempranas luego de la infección viral (Palomares et al., 2002).

La expresión de la α LTX recombinante utilizando el sistema de células de insecto-baculovirus se realizó bajo el promotor de la poliedrina, y se ha reportado que los mayores niveles de expresión de dicha proteína ocurren entre las 36 y 48 horas postinfección (O'Reilly et al., 1994). El grupo 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 para expresar la α LTX recombinante en suspensión y en medio de cultivo sin STF.

El proceso de purificación parcial de la α LTX consta esencialmente de dos pasos de intercambio iónico, primeramente el sobrenadante de cultivo se pasa a través de un filtro que contiene una membrana de intercambio aniónico en el cual se eliminan una parte de los contaminantes. Posteriormente las proteínas eluidas del filtro se pasan a través de una columna MonoQ acoplada a un sistema de FPLC, cuyo principio de separación es también el intercambio aniónico. La α LTX purificada de esta forma se obtuvo con un porcentaje de pureza bajo, lo cual concuerda con lo reportado por Volynski et al. (1999), quienes obtuvieron la α LTX recombinante de *L. tredecimguttatus* con una pureza final del 40-60 % en una solución cuya concentración total de proteína es de 0.7 mg/mL. La DL_{100} reportada por este grupo es de 3.4 μ g de α LTX/ratón. Este grupo demostró que la α LTX recombinante mantuvo las mismas propiedades fisiológicas de la α LTX nativa purificada a partir del veneno de la araña *L. tredecimguttatus*, mediante la medición *in vitro* de la liberación de neurotransmisores en uniones neuromusculares de ratón así como mediante la interacción con los receptores específicos latrofilina y neurexina 1- α . Es interesante que estos estudios *in vitro* se realizaron con el sobrenadante de cultivo de las células de insecto infectadas con el baculovirus recombinante y no con las fracciones de la α LTX purificada.

Otros grupos han reportado la purificación de la de la α LTX recombinante de *L. tredecimguttatus* utilizando el sistema de células de insecto-baculovirus. Ichtchenko et al. (1998) expresaron la α LTX fusionada a una cola de 8 histidinas tanto en el extremo amino como en el carboxilo terminal. Esta latrotoxina recombinante fue purificada mediante un paso de intercambio aniónico utilizando una columna de DEAE-Sepharosa (Pharmacia) seguido de una cromatografía de afinidad utilizando una columna de Ni^{2+} -NTA (Qiagen). El rendimiento reportado es de 1mg de α LTX por litro de cultivo. Estos rendimientos son comparables a los obtenidos en nuestro proceso de producción: si tenemos en cuenta que la DL_{50} del veneno de *L. mactans* es de 5-10 μ g/ratón (Daly, et al.,

2001) y que la α LTX constituye aproximadamente el 20 % del veneno, entonces tenemos una DL_{50} para la α LTX de aproximadamente 1-2 μ g de proteína/ratón. La α LTX producida en este trabajo fue suficiente para envenenar fuertemente y, en ocasiones, matar ratones con 500 μ L de sobrenadante de cultivo inyectados por vía intravenosa, por lo que tenemos un rendimiento aproximado de 1-3 μ g/mL de α LTX recombinante secretada al sobrenadante de cultivo.

La visualización de la α LTX recombinante, tanto secretada al sobrenadante de cultivo como a partir de las fracciones cromatográficas, resultó difícil mediante SDS-PAGE y tinción con Azul de Coomassie. Es por esto que decidimos utilizar otro método más sensible para teñir proteínas, como el nitrato de plata. El análisis del contenido total de proteínas presentes tanto en el sobrenadante de cultivo como en las fracciones obtenidas luego del proceso de purificación de la α LTX, muestra la presencia de numerosas proteínas contaminantes.

A lo largo de los años se ha optimizado la formulación de medios de cultivo libres de STF con el objetivo de minimizar la presencia de contaminantes que dificultan la purificación de las proteínas recombinantes. Esto se debe a que en el STF están presentes numerosas proteínas del suero, factores de crecimiento, lípidos, hormonas, inhibidores de proteasas, entre otras moléculas. Para el crecimiento de las células H5 se utilizan actualmente medios de cultivo libres de suero, como el medio SF900-II SFM de formulación patentada (Gibco, Invitrogen). No obstante, se sabe que uno de los componentes fundamentales de este medio de cultivo es el extracto de levadura, el cual es una mezcla no definida de aminoácidos, péptidos, vitaminas, minerales y carbohidratos (Sommer, 1996). Esta mezcla de péptidos puede contribuir a aumentar la complejidad del sobrenadante de cultivo y, por ende, a dificultar la purificación de la α LTX.

Otro 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. Los baculovirus son virus líticos, por tanto producen y liberan proteasas durante el curso de las infecciones. Las proteasas también pueden producirse por las células de insecto

luego de la infección con los baculovirus como una respuesta al estrés celular, o bien pueden liberarse el medio de cultivo luego de la lisis celular (proteasas lisosomales). La proteólisis puede exacerbarse en cultivos libres de STF debido a la ausencia de proteínas como la albúmina y globulinas, que confieren protección frente a la degradación proteolítica (Ikonomou et al., 2003). En un estudio para determinar las proteasas presentes en células H5 sin infectar, se identificaron varias metaloproteasas con pesos moleculares entre 32 y 42 kDa, las cuales fueron inhibidas con 2-10 mM de 1,10-fenantrolina (Ikonomou et al., 2002).

La proteólisis es además un fenómeno que afecta la calidad de la proteína recombinante. En este estudio demostramos que para las células H5 sembradas a una densidad inicial de $1 \cdot 10^6$ células/mL, a las 72h postinfección ya se observa degradación proteolítica de la α LTX. Para el caso del virus *Autographa californica* NPV se han identificado varias proteasas, entre ellas una cisteína-proteasa, v-cath (32-35 kDa), la cual se expresa a las 48h postinfección y cuya actividad es completamente inhibida por el compuesto E-64 (Slack et al., 1995; Naggie y Bentley, 1998). Con todos estos antecedentes, decidimos adicionar un inhibidor de proteasas a los sobrenadantes de cultivo colectados para la purificación de la α LTX recombinante, y así disminuir la degradación proteolítica de la proteína durante el proceso de purificación. Para controlar el proceso de proteólisis en cultivos de células de insecto se han utilizado diferentes inhibidores de proteasas como el PMSF, Pefablo SC, leupeptina y E-64 (Schmid y Bischoff, 1998). También se han utilizado mezclas de inhibidores de cisteína y serina-proteasas (Grosch y Hasilik, 1998). Sin embargo, la proteólisis no es siempre perjudicial para la expresión de proteínas recombinantes, ya que ciertas modificaciones post-traduccionales de las mismas son necesarias. Tal es el caso de la α LTX, la cual se sintetiza fusionada al péptido señal de la melitina y sufre un corte proteolítico entre la Ala²¹ y el Asp²² en las células de insecto, direccionando su secreción al sobrenadante de cultivo. Debido a este fenómeno, el uso de inhibidores de proteasas no es aconsejable durante el proceso de infección, sino después de colectado el sobrenadante de cultivo. Otra alternativa que permite minimizar los daños por proteólisis del producto recombinante es la manipulación de diferentes parámetros de cultivo como son la densidad celular al momento de la infección, la MOI y el tiempo de recolección del cultivo.

En ensayos preliminares de toxicidad, tanto del sobrenadante de cultivo como de la proteína recombinante luego de su purificación parcial, observamos que la α LTX mantiene sus propiedades fisiológicas, ya que provoca en los animales los síntomas descritos para el latroductismo: ojos cerrados, dolor, sudoración, ataxia, pelo erizado y en algunos casos la muerte de los ratones.

El estudio de la respuesta inmune humoral desarrollada en conejos inmunizados con la α LTX recombinante dio como resultado que existen anticuerpos capaces de reconocer el veneno de *L. mactans* por ELISA, aunque los títulos son bajos. Es de destacar que en el conejo donde se alternaron ambos adyuvantes (AIF y alúmina), la respuesta inmune fue mayor a la observada en el conejo donde sólo se utilizó AIF. Este resultado concuerda con los estudios realizados por Prud'Homme (2004) al inmunizar conejos con el dominio amino de la α LTX, donde se observó que sólo cuando se utilizaba alúmina como adyuvante, se inducía una respuesta inmune capaz de proteger contra el veneno nativo de *L. mactans* en ensayos de protección pasiva en ratones.

En nuestro grupo se han expresado otras proteínas recombinantes con el objetivo de utilizarlas como inmunógenos para la producción de antivenenos, tal es el caso de la expresión de las esfingomielinasas recombinantes de las arañas *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta* utilizando células de *E. coli* (Ramos-Cerrillo et al., 2004). En este caso, se inmunizaron conejos con dosis crecientes de estas proteínas recombinantes (30-100 μ g), con un 90% de pureza. En este caso, los títulos de anticuerpos frente a las respectivas toxinas recombinantes medidos por ELISA oscilaron entre 1/37,000 y 1/100,000. Estos sueros hiperinmunes fueron capaces de neutralizar al veneno nativo de las arañas *Loxosceles* estudiadas (Ramos-Cerrillo, 2005).

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 previos obtenidos en nuestro grupo, es lógico pensar que debemos enfocarnos en desarrollar un protocolo de purificación de la α LTX recombinante que nos permita obtenerla con un alto grado de pureza. Es por esto

que una de las alternativas en las que estamos trabajando es agregar una cola de histidinas al dominio amino de la α LTX 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. Siendo así, también podríamos utilizarla como sustituto del veneno de *L. mactans* en los ensayos de neutralización *in vivo* que se realizan para evaluar la efectividad del faboterápico Aracmyn[®].

VI. Conclusiones

1. El cADN de la α -latrotoxina activa de *Latrodectus mactans*, a pesar de su tamaño y complejidad, fue clonado de manera exitosa en el vector de transferencia baculoviral pMelBacA.
2. Se generaron baculovirus recombinantes que contienen en su secuencia nucleotídica el gen de la α LTX fusionado a la secuencia del péptido señal de la melitina.
3. Utilizando el sistema de células de insecto-baculovirus, se expresó por primera vez de manera activa y soluble, la α -latrotoxina recombinante de la araña *Latrodectus mactans* así como el dominio amino de esta proteína.
4. Si bien el proceso de purificación de la α LTX recombinante no nos permitió obtener una preparación final con un alto grado de pureza, sí pudimos aprender mucho sobre las propiedades bioquímicas de esta molécula y enfocarnos en el desarrollo de nuevas alternativas de purificación.
5. En experimentos de toxicidad utilizando ratones, se demostró que la α LTX recombinante mantiene las mismas propiedades fisiológicas que el veneno nativo de *L. mactans*, ya que fue capaz de inducir los síntomas característicos del envenenamiento por la mordedura de la araña viuda negra.
6. Los conejos inmunizados con diferentes preparaciones de la α LTX recombinante desarrollaron una respuesta de anticuerpos capaces de reconocer el veneno nativo de *L. mactans*.

VII. Perspectivas

1. Obtener de nueva cuenta baculovirus recombinantes que expresen la α LTX fusionada a una cola de 6 histidinas en el extremo 5' del dominio amino, con el objetivo de facilitar el proceso de purificación de la proteína a través de una cromatografía de afinidad utilizando una columna de Ni^{2+} -NTA.
2. Inmunizar conejos con preparaciones más puras de la α LTX recombinante para aumentar el título de anticuerpos y estudiar la capacidad de los mismos de neutralizar el veneno nativo de la araña *L. mactans*.
3. En caso de generarse anticuerpos neutralizantes en conejos, realizar estudios de la inmunogenicidad de la α LTX recombinante en caballos con el fin de implementar su uso como inmunógeno en la producción del antiveneno Aracmyn[®].
4. Profundizar en los mecanismos de acción de la α LTX a nivel celular utilizando diferentes preparaciones de uniones neuromusculares de mamíferos.

VIII. Referencias Bibliográficas

- Alvarez del Toro, M., (1992), Arañas de Chiapas. Universidad Autónoma de Chiapas, México, 203-231.
- Andrade, M.A; Pérez-Iratxeta, C., Ponting, C.P. (2001) Protein repeats: structure, functions, and evolution. *J. Struct. Biol*, 134:117-131.
- Ashton, A.C., Rahman, M.A., Volynski, K.E., Manser, C., Orolova, E.V., Matsushita, H., Davletov, B.A., Van Heel, M., Grishin, E.V., Ushkaryov, Y.A. (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.
- Ashton, A.C., Volynski, K.E., Lelianaova V.G., Orlova, E.V., Van Renterghem, C., Canepari, M., Seagar, M., Ushkaryov, Y.A. (2001) α -latrotoxin, acting via two Ca^{2+} -dependent pathways, triggers exocytosis of two pools of synaptic vesicles. *J. Biol. Chem*, 276: 44695-44703.
- Auger, C., Marty, A. (1997) Heterogeneity of functional synaptic parameters among single release sites. *Neuron*, 19: 139-150.
- Baba, A., Cooper, J.R. (1980) The action of black widow spider venom on cholinergic mechanisms in synaptosomes. *J Neurochem*, 34:1369-1379.
- Barnes, R., (1989). *Zoología de los Invertebrados*. Interamericana, 5a edición, México.
- Calmette, A. (1895) Contribution a l'étude des venins. *Ann Inst Pasteur*, 9: 225-251.
- Capogna, M., Volynski, K.E., Emptage, N.J., Ushkaryov, Y.A. (2003) The α -latrotoxin mutant LTX^{N4C} enhances spontaneous and evoked transmitter release in CA3 pyramidal neurons. *J Neurosci*, 23: 4044-4053.
- Carroll, S.B., Thalley, B.S., Theakston, R.D., Laing, G. (1992) Comparison of the purity and efficacy of affinity purified avian antivenoms with commercial equine crotalid antivenoms. *Toxicon*, 30:1017-1025.
- Ceccarelli, B., Hurlbut, W.P. (1980) Ca^{2+} -dependent recycling of synaptic vesicles at the frog neuromuscular junction. *J. Cell. Biol*, 87: 297-303.
- Chávez-Haro, A.L. (2007) En los territorios de Scorpio. Experiencias y recuerdos de un alacranólogo. Libro. Editorial Mastercopy, SA de CV. México, octubre 2007.
- Daly FF, Hill R.E., Bogdan, G.M., Dar,t R.C. (2001) Neutralization of *Latrodectus mactans* and *L. hesperus* venom by redback spider (*L. hasselti*) antivenom. *J Toxicol Clin Toxicol*, 39:119-23.
- Danilevich, V.N., Grishin, E.V. (2000) The chromosomal genes for black widow spider neurotoxins do not contain introns. *Bioorg. Khim*, 26: 933-939.
- 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*, May;29A:388-90.
- Dulubova, L.E., Krasnoperov, V.G., Khvotchev, M.V., Pluzhnikov, K.A., Volkova, T.M., Grishin, E.V., Vais, H., Bell, D.R., Unsherwood, P.N. (1996) Cloning and structure of α -latroinsectotoxin, a novel insect-specific member of the latrotoxin family: functional expression requires C-terminal truncation. *J. Biol. Chem*, 271: 7535-7543.
- Finkelstein, A., Rubin, L.L., Tzeng, M.C. (1976) Black widow spider venom: effect of purified toxin on lipid bilayer membranes. *Science*, 193: 1009-1011.
- 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.
- Gertsch, Willis, J., (1949), *American spiders*, D. Van Nostrand Company, Inc. E.U.A., 31-33, 248-254.

- Giribert, G., Ribera, C. (1998) The position of arthropods in the animal kingdom: A search for a reliable outgroup for internal arthropod phylogeny. *Mol. Phylog. Evol.*, 9: 481-488.
- 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.
- Grasso, A. (1976) Preparation and properties of a neurotoxin purified from the venom of black widow spider (*Latrodectus mactans tredecimguttatus*). *Biochim. Biophys. Acta*, 439: 406-412.
- Grasso, A. (1988) α -latrotoxin as a tool for studying ion channels and transmitter release process. *Neurotoxins in Neurochemistry*, Department of Biochemistry, Inglaterra, 67-78.
- Grishin, E. (1996) Neurotoxins from black widow spider venom, structure and function. *Natural Toxins II*, Plenum Press, E.U.A. 231-236.
- Grosch, H.W., Hasilik, A. (1998) Protection of proteolysis-prone recombinant proteins in baculovirus expression systems. *Biotechniques*, Jun;24:930-2, 934.
- Gruenwald, S., Heitz, J. (1993) *Baculovirus expression vector system: Procedures and methods manual*. Second edition. Pharmingen. San Diego, California.
- Hickman, R., (1991), *Zoología General*. Editorial Interamericana, México, 352-369.
- Hlubek, M.B., Stuenkel, E.L., Krasnoperov, V.G., Petrenko, A.G., Holz, R.W. (2000) Calcium-independent receptor for α -latrotoxin and neurexin I α facilitate toxin-induced channel formation: evidence that channel formation results from tethering of toxin to membrane. *Mol. Pharmacol*, 57: 519-528.
- Hoffmann, A., (1993), *El maravilloso mundo de los arácnidos*, Fondo de Cultura Económica, S.A. de C.V., México, 74-101.
- Hurlbut, W.P., Chiergatti, E., Valtorta, F., Haimann, C. (1994) α -latrotoxin channels in neuroblastoma cells. *J. Membr. Biol.*, 138: 91-102.
- Hurlbut, W.P., Iezzi, N., Fesce, R., Ceccarelli, B. (1990) Correlation between quantal secretion and vesicle loss at the frog neuromuscular junction. *J. Physiol. (London)*, 425: 501-526.
- Ichtchenko, K., Khvotchev, M., Kiyatkin, N., Simpson, L., Sugita, S., Sudhof, T. C. (1998) α -latrotoxin action probed with recombinant toxin: receptors recruit α -latrotoxin but do not transduce an exocytotic signal. *EMBO J*, 17: 6188-6199.
- Ignoffo, C.M. (1975) *Baculoviruses for insect pest control: safety considerations*, Summers, M., Engler, R., Falcon, L.a., Vail, P.V. (eds.) American Society for Microbiology, Washington, DC, p. 52.
- Ikonomou, L., Peeters-Joris, C., Schneider, Y.J., Agathos, S.N. (2002) Supernatant proteolytic activities of High-five insect cells grown in serum-free culture. *Biotechnol Lett.* 24: 965–69.
- Ikonomou, L., Schneider, Y.J., Agathos, S.N. (2003) Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl Microbiol Biotechnol.* 62:1-20.
- Kiyatkin, N., Dulubova, I., Chekhovskaya, I., Grishin, E. (1990) Cloning and structure of cDNA encoding α -latrotoxin from black widow spider venom. *FEBS*, 270: 127-131.
- Kiyatkin, N., Dulubova, I., Chekhovskaya, I., Lipkin, A., Grishin, E. (1992) Structure of the low molecular weight protein copurified with α -latrotoxin. *Toxicon*, 30: 771-774.
- Kiyatkin, N., Dulubova, I., Grishin, E. (1993) Cloning and structural analysis of α -latrotoxin cDNA, abundance of ankyrin repeats. *Eur. J. Biochem*, 213: 121-127.
- 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. *Neuroscience*, 19: 55-62.
- Krasilnikov, O.V., Sabirov, R.Z. (1992) Comparative analysis of latrotoxin channels of different conductance in planar lipid bilayers. Evidence for cluster organization. *Biochim. Biophys. Acta*, 1112: 124-128.

- Krasnoperov, V.G., Bittner, M.A., Beavis, R., Kuang, Y., Salnikow, K.V., Chepurny, O.G., Little, A.R., Plotnikov, A.N., Wu, D., Holz, R.W., Petrenko, A.G. (1997) α -Latrotoxin stimulates exocytosis by the interaction with a neuronal G-protein-coupled receptor. *Neuron*, 18: 925-937.
- Krasnoperov, V.G., Shamotienko, O.G., Grishin, E.V. (1990a) A crustacean-specific neurotoxin from the venom of the black widow spider *Latrodectus mactans tredecimguttatus*. *Bioorg. Khim*, 16: 1567-1569.
- Krasnoperov, V.G., Shamotienko, O.G., Grishin, E.V. (1990b) Isolation and properties of insect-specific neurotoxins from venoms of the spider *Latrodectus mactans tredecimguttatus*. *Bioorg. Khim*, 16: 1138-1140.
- Laloo, D.G., Theakston, D.G. (2003) Snake antivenoms. *J. Toxicol*, 41: 277-290.
- Lang, J., Ushkaryov, Y., Grasso, A., Wollheim, C.B. (1998) Ca²⁺-independent insulin exocytosis induced by alpha-latrotoxin requires latrophilin, a G protein-coupled receptor. *EMBO J*, 17: 648-657.
- Lelianova, V.G., Davletov, B.A., Sterling, A., Rahman, M.A., Grishin, E.V., Totty, N.F., Ushkaryov, Y.A. (1997) α -Latrotoxin receptor, latrophilin, is a novel member of the secretin family of G protein-coupled receptors. *J. Biol. Chem*, 272: 21504-21508.
- Liu, J., Mislser, 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.
- Maraboto-Martínez, J.A., Chávez-Haro, A., García-Willis, A., Rivas, M., Alagón, C.A. (1997) Mexican Instituto of Security: Epidemiological data on Scorpion and snake accidents and their treatment. 12th World Congress on Animal Plant and Microbial toxins, Cuernavaca, Mor.
- Mena, J.A., Ramírez, O.T., Palomares, L.A. (2006) Intracellular distribution of rotavirus structural proteins and virus-like particles expressed in the insect cell-baculovirus system. *J Biotechnol*, 122:443-52.
- Naggie, S., Bentley, W.E. (1998) Appearance of protease activities coincides with p10 and polyhedrin-driven protein production in the baculovirus expression system: effects on yield. *Biotechnol Prog*, 14: 227-32.
- O'Reilly, D.R., Miller, L.K., Luckow, V.A. (1994) Baculovirus expression vectors. A laboratory manual. New York. Oxford University Press.
- Orolova, E.V., Arman, M.A., Gowen, B., Volynski, K.E., Ashton, A.C., Manser, C., van Heel, M., Ushkaryov, Y.A. (2000) Structure of α -latrotoxin oligomers reveals that divalent cation-dependent tetramers form membrane pores. *Nat. Struct. Biol*, 7: 48-53.
- Palomares, L.A. (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*, Jun 20: 635-44.
- Patel, G., Greenfield, C., Stabel, S., Waterfield, M.D., Parker, P.J., Jones, N.C. (1988) The overproduction of biologically active E1a, EGF receptor, and protein kinase C proteins in the baculovirus expression system. *Curr Comm Mol Biol: Viral Vectors* ed. Pp 98-103.
- Pescatori, M., Bradbury, A., Bouet, F., Gargano, N., Mastrogiacomo, A., Grasso, A. (1995) The cloning of a cDNA encoding a protein (latrotoxin) which co-purifies with the latrotoxin from the black widow spider *Latrodectus tredecimguttatus* (Theridiidae). *Eur. J. Biochem*, 230: 322-328.
- Petricevich, 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.
- Phisalix, C., Bertrand, G. (1895) Recherches sur l'immunité du herisson contre le venin de vipere. *C. R. Seanc. Soc. Biol.* 47, p. 639.
- Pineda, D., (2002), Accidentes por Animales Venenosos, Instituto Nacional de Salud, 1era edición, Colombia.
- Platnick, N.I. (1993) Advances in spider taxonomy 1998-1991: with synonymies and transfers 1940-1980, New York Entomological Society, New York.

- Platnick, N.I. (1997) *Advances in spider taxonomy 1992-1995: with redescrptions 1940-1980*, New York Entomological Society, New York, pp. 1-976.
- Pope, C.G. (1939) The action of proteolytic enzymes on the antitoxins and proteins in immune sera. *Br. J. Exp. Pathol*, 20: 132-149.
- Prud'homme, M.A. (2004) *Producción y evaluación de antígenos recombinantes de la α -latrotoxina de *Latrodectus mactans**. Tesis de Maestría, IBT, UNAM.
- Ramos-Cerrillo, B. (2005) *Producción, evaluación y caracterización de los inmunógenos recombinantes de las esfingomielinasas de *L. boneti*, *L. reclusa* y *L. laeta**. Tesis de Maestría, IBT. UNAM.
- Ramos-Cerrillo, B., Olvera, A., Odell, G.V., Zamudio, F., Paniagua-Solís, J., Alagón, A., Stock, R.P. (2004) Genetic and enzymatic characterization of sphingomyelinase D isoforms from the North American fiddleback spiders *Loxosceles boneti* and *Loxosceles reclusa*. *Toxicon*, 44: 507-14.
- Rash, L., Hodgson, W., (2002), *Pharmacology and biochemistry of spider venoms*, *Toxicon*, 40: 225-254.
- Rhiel, M., Mitchell-Logean, C.M., Murhammer, D.W. (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.
- Robello, M., Fresia, M., Maga, L., Grasso, A., Ciani, S. (1987) Permeation of divalent cations through α -latrotoxin channels in lipid bilayers: steady state current-voltage relationships. *J. Membr. Biol*, 95: 55-62.
- Rosenthal, L., and Meldolesi, J., (1989), α -Latrotoxin and related toxins, *Pharmac. Ther*, 42: 115-134.
- Rosenthal, L., Zacchetti, D., Madededu, L., Meldolesi, J. (1990) Mode of action of alpha-latrotoxin: role of divalent cations in Ca^{2+} -dependent and Ca^{2+} -independent effects mediated by the toxin. *Mol. Pharmacol*, 38: 917-923.
- Russell, F.E. (1988) Snake venom immunology: historical and practical considerations. *J. Toxicol-Toxin Rev*, 7: 1-82.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec;74: 5463-7.
- Schmid, G., Bischoff, A. (1998) Proteolytic activities in the baculovirus-insect cell expression system. In: Merten O-W, Perrin P, Griffiths B (eds) *New developments and new applications in animal cell technology*. Kluwer Academic, Dordrecht, pp 303-306.
- Sedgwick, S.G., Smerdon, S.J. (1999) The ankyrin repeats: a diversity of interactions on a common structural framework. (1999) *Trends Biochem. Sci*, 24: 311-316.
- Sewall, H. (1887) Experiments on the preventative inoculation of rattlesnake venom. *J. Physiol*, 8: 203-210.
- Slack JM, Kuzio J, Faulkner P. (1995) Characterization of v-cath, a cathepsin L-like proteinase expressed by the baculovirus *Autographa californica* multiple nuclear polyhedrosis virus. *J Gen Virol*, 76:1091-8.
- Smith, G.E., Summers, M.D., Fraser, M.J. (1983) Production of human beta interferon in insect *cells* infected with a baculovirus expression vector. *Mol Cell Biol*, 3: 2156-2165.
- Sommer, R. (1996) Yeast extracts: production, properties and components. In: 9th International Symposium on Yeasts, Sydney, August 1996.
- Sutherland, S.K. (1994) Antivenom research in Australia. *Med. J. Aust*, 161: 48-50.
- Tessier, D.C., Thomas, D.Y., Khouri, H.E., Laliberté, F., Vernet, T. (1991) Enhanced secretion from insect *cells* of a foreign protein fused to the honeybee melittin signal peptide. *Gene*, 98: 177-183.
- Thalley, B.S., Carroll, S.B. (1990) Rattlesnake and scorpion antivenoms from the egg yolks of immunized hens. *Biotechnol (NY)*, 8: 934-938.
- Tu, A., (1984), *Handbook of Natural Toxins 2, Insect Poisons, allergens and other invertebrate venoms*, Marcel Dekker Inc. E.U.A. 397-512.

- Tzeng, M., Cohen, R., Siekevitz, P., (1978). Release of neurotransmitters and depletion of synaptic vesicles in cerebral cortex slices by α -latrotoxin from black widow spider venom. *Neurobiology*, 75: 4016-4020.
- Ushkaryov, Y.A., Petrenko, A.G., Geppert, M., Sudhof, T.C. (1992) Neurexins: synaptic cell surface proteins related to the α -latrotoxin receptor and laminin. *Science*, 257: 50-56.
- Van Reenterghem, C., Iborra, C., Martín-Moutot, N., Lelianova, V. (2000) α -latrotoxin forms calcium-permeable membrane pores via interactions with latrophilin or neurexin. *Eur. J. Neurosci*, 12: 3953-3962.
- Volkova, T.M., Pluzhnikov, K.A., Woll, P.G., Grishin, E.V. (1995) Low molecular weight components from black widow spider venom. *Toxicon*, 33: 483-489.
- Volynski, K.E., Capogna, M., Ashton, A.C., Thomson, D., Orlova, E.V., Manser, C.F., Ribchester, R.R., Ushkaryov, Y.A. (2003) Mutant α -latrotoxin (LTX^{N4C}) does not form pores and causes secretion by receptor stimulation. This action does not require neurexins. *J. Biol. Chem*, 278: 31058-31066.
- Volynski, K.E., Meunier, F.A., Lelianova, V.G., Dudina, E.E., Volkova, T.M., Rahman, M.A., Manser, C., Grishin, E.V., Dolly, J.O., Ashley, R.H., Ushkaryov, Y.A. (2000) Latrophilin, neurexin and their signaling-deficient mutants facilitate α -latrotoxin insertion into membranes but are not involved in pore formation. *J. Biol. Chem*, 275: 41175-41183.
- Volynski, K.E., Nosyreva, E.D., Ushkaryov, Y.A., Grishin, E.V. (1999) Functional expression of α -latrotoxin in baculovirus system. *FEBS Letters*, 442: 25-28.
- Volynski, K.E., Volkova, T.M., Galkina, T.G., Krasnoperov, V.G., Pluzhnikov, K.A., Khvoshchev, M.V., Grishin, E.V. (1999b) Molecular cloning and primary structure of cDNA fragment for α -latrocrustatoxin from black widow spider venom. *Bioorg. Khim*, 25: 25-30.
- Wanke, E., Ferroni, A., Gattani, P., Meldolesi, J. (1986) α -latrotoxin of the black widow spider venom opens a small, non-closing cation channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 134: 320-325.

APÉNDICE DE SOLUCIONES

TAE 50X

Trizma base (2M)	242 g
Na ₂ EDTA (50 mM)	18.6 g
Bromuro de etidio (25 mg/mL)	2.5 ml (10 mg/ml)
Ácido acético glaciado para pH 7	60 ml aprox.
Aforar a 1 lt con agua desionizada.	

Loading buffer

0.25 % Azul de bromofenol	250 mg
0.25% Xilen Cialo FF	250 mg
30% Glicerol	28 mL
TAE 50X	2 mL
Aforar con 70 mL de agua	

Medio SOC

Triptona o peptona	20 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	0.58 g
Disolver en agua destilada y adicionar 10 mL de cloruro de potasio 250 mM (1.86 g de KCl en 100 mL de agua) ajustar el pH a 7.0 con hidróxido de sodio 5 N (\approx 0.2 mL). Aforar a 1 lt con agua desionizada. Autoclavear a 121 °C por 20 minutos.	
Agregar 10 mL de Cloruro de magnesio 1M (8 g de MgCl ₂ en 90 mL de agua) y 10 mL de Sulfato de magnesio (Mg SO ₄) 1M estéril.	
Agregar 20 mM glucosa filtrada con membranas de 0.22 micras.	

Medio LB (Luria-Bertani)

A 950 mL de agua adicionar :	
Extracto de levadura:	5 g
Bacto triptona	10 g
Cloruro de sodio	10 g
Mezclar. Ajustar el pH a 7.0 con 5N hidróxido de sodio (\approx 0.2 mL) ajustar el volumen a 1 lt con agua desionizada. Esterilizar a 121 °C por 20 minutos.	

SDS-PAGE

REACTIVOS

- Solución de acrilamida - (30% acrilamida + 0.8 bis-Acrilamida). Disolver 50 g de acrilamida y 1.2 de bisacrilamida en un volumen final de 165 mL de agua desionizada.
- Solución espaciadora - (1.5M tris + 0.4% SDS). Disolver 18.17g de Tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 2 mL de 20% SDS. Ajustar a pH 6.8 con HCL concentrado. Aforar a 100 mL.
- Solución concentradora - (0.5M Tris + 0.4% SDS) disolver 6.06 g de Tris en 50 mL de agua desionizada y adicionar 2 mL de 20% SDS. Ajustar a pH 6.8 con HCL concentrado. Aforar a 100 mL.
- Solución de corrida - (0.25M Tris + 0.19M Glicina + 0.1% SDS). Para una solución 10X, disolver 15.2g de Tris y 72.1 g de glicina en 300 mL de agua desionizada y adicionar 25 mL de 20 % SDS. Ajustar a pH 8.6 con 10M NaOH. Aforar a 500 mL.
- Buffer 2X de la muestra (10% glicerol + 2.5% SDS + 50 mM Tris-HCl, pH 6.8 + 5% 2-mercaptoetanol + 0.002% Azul de bromofenol). En un tubo de 15 mL, mezclar los siguientes volúmenes: 1 mL de glicerol; 1.25 mL de 20% SDS; 0.5 mL de 1M Tris-HCl, pH 6.8; 0.5 mL de 2-mercaptoetanol; 0.2 mL de 1% azul de bromofenol. Aforar a 10 mL con agua desionizada.
- 10% Persulfato de amonio. Disolver 0.1g de persulfato de amonio en 1mL de agua desionizada
- Solución de tinción - azul de Coomasie (50% Metanol + 10% ácido acético + 0.2% Azul de Coomasie G250). Disolver 1g de azul de Coomasie G250 en 250 mL de etanol, 50 ml de ácido acético y aforar a 500 mL con agua desionizada.
- Solución de destinción (10% Metanol + 10% ácido acético): mezclar 400 mL de agua desionizada, 50 mL de metanol y 50 mL de ácido acético.

ENSAYOS DE WESTERN-BLOT

1) TBST 10X

50 mL de Tris-HCl 1 M pH 7.5
150 mL de NaCl 5 M
2.5 mL de Tween 20
Aforar a 500 mL

2) Solución de bloqueo

5 gr de leche en polvo
100 mL de TBST 1X
1 mL de azida de sodio al 0.02%

3) Cloruro de sodio 5 M

146.1 gr de NaCl y llevarlo a 500 mL con agua

4) Solución de transferencia

39 mM glicina → 1.45 gr
48 mM Tris-base → 2.9 gr
0.037 % SDS → 0.185 gr
20 % Metanol → 100 mL

Llevar todo a 500 mL con agua