



SELECCIÓN CLONAL DE CÉLULAS CHO PARA PRODUCIR UN ANTICUERPO QUE RECONOZCA LA ESFINGOMIELINASA-D DE LA ARAÑA *LOXOSCELES RECLUSA*

Guillermo E. Maldonado García, Alejandro Olvera, Alejandro Alagón, Mauricio A. Trujillo Roldán, Norma A. Valdez Cruz

Universidad Nacional Autónoma de México UNAM, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Delegación Coyoacán, Distrito Federal C.P. 04510, *adrivaldez1@gmail.com

Palabras clave: Anticuerpos monoclonales, cultivo celular, esfingomielinasa-D.

Introducción. El veneno de la araña *Loxosceles* es una mezcla peptídica, cuyo compuesto principal es la esfingomielinasa D (SMD) y que es el responsable de generar un padecimiento conocido como loxoscelismo (1). Para contrarrestar la toxicidad del veneno se desarrolló un anticuerpo monoclonal (mAb) en hibridomas, que es capaz de reconocer y neutralizar la actividad de una SMD recombinante (2). Sin embargo, para su producción se requiere de un sistema de expresión con altos rendimientos, que sea capaz de producir el mAb correctamente plegado y con las modificaciones post-traduccionales necesarias para su función (3).

El objetivo de este proyecto es producir un anticuerpo monoclonal que reconozca la SMD, usando cultivos de células CHO DG44.

Metodología. Las células CHO DG44 se cultivaron en medio CD-DG44 (Invitrogen), para después transfectarlas con diferentes combinaciones de plásmidos que contienen los genes codificantes para la cadena pesada y la cadena ligera del anticuerpo anti-SMD.

Las células transformantes fueron seleccionadas en medio OptiCHO™, con antibióticos y metotrexato (MTX). El sobrenadante fue separado y guardado con inhibidor de proteasas a -20°C. Posteriormente, el sobrenadante fue separado mediante SDS-PAGE. El anticuerpo se trató de identificar mediante Western-blot con un anticuerpo anti-IgG humano.

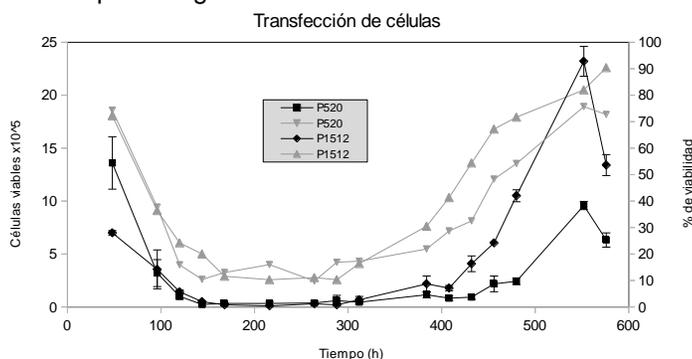


Fig. 1. Cinética de cultivos de células CHO DG44 transfectadas con 2 combinaciones de plásmidos, usando una lipofectamina comercial.

Resultados. La transfección de los plásmidos con genes codificantes para la cadena pesada y la cadena ligera independientes permitió crecer a las células CHO DG44

con una concentración celular máxima de 3.9×10^6 células por mL en una concentración 20 nM de MTX.

Los sobrenadantes de estas células fueron evaluados por SDS y Western blot donde se observó una banda de un peso aproximado de 100 kDa.

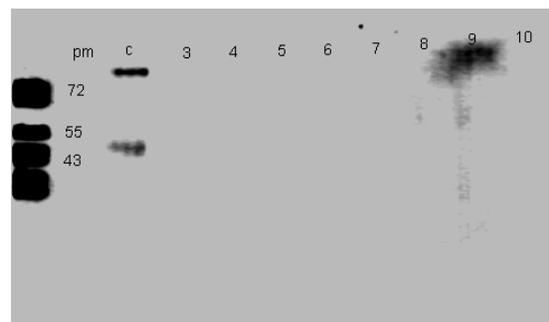


Fig. 2. Western blot de sobrenadantes colectados a diferentes tiempos de cultivo. Se observa en el carril 9 reconocimiento de cadena pesada a 100 kDa.

Conclusiones. Actualmente se tienen varias clonas seleccionadas que se están evaluando. En el Western blot se observó una banda de aproximadamente 100 kDa, indicando una posible dimerización de la cadena pesada tal como se observó en el control positivo. Sin embargo, es necesario concentrar la proteína de los sobrenadantes usados, así como realizar una prueba ELISA que permita cuantificar la cantidad de anticuerpo producido.

Agradecimiento. A CONACYT por la beca otorgada a Guillermo Eduardo Maldonado García para la realización de este proyecto de Maestría. CONACyT 220795, 178528, 181895 y PAPIIT-UNAM (IN209113, IN210013, IN208415).

Bibliografía

1. Tambourgi DV, Paixão-Cavalcante D, Gonçalves de Andrade RM, Fernandes-Pedrosa Mde F, Magnoli FC, Paul Morgan B, van den Berg CW. (2005). *J Invest Dermatol* 2005; 124 (4): 725-31.
2. Moctezuma C. Tesis profesional de maestría. Instituto de Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, Morelos 2008. 53 pp.
3. Campos E. Tesis profesional de licenciatura. Instituto de Biotecnología. UNAM, Cuernavaca, Morelos 2010. 61 pp.