

## Entrevista a Eduardo Cánepa

### **“Es necesario estimular la comunicación y la integración entre los distintos grupos de investigación”**

**Por Susana Gallardo y Julia Pettinari**

Es doctor en Química, investigador del Conicet y profesor del Departamento de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la UBA. Trabaja en biología molecular, más específicamente, su interés se centra en desentrañar los mecanismos de regulación de la expresión de los genes y la regulación del ciclo celular. En septiembre de 2005 fue elegido como director del Departamento. En este rol, apuesta a realizar algunos cambios que considera imprescindibles:



fomentar el intercambio y la integración entre los distintos grupos de investigación, y establecer un sistema de evaluación externa de la actividad científica que se desarrolla en el departamento. Se muestra enérgico y con ideas claras. Vive en Palermo, tiene un hijo de 19 años y dice trabajar más de diez horas diarias, incluyendo muchos sábados y domingos.

#### ***QV. ¿Cómo fue que decidió dedicarse a la investigación?***

EC. En el colegio, lo que más me atraía era la historia y la química. Ya de chico, me había armado un laboratorio en mi casa, y con la ayuda de libros viejos de química trataba de hacer experimentos. Me interesaba la química en particular, pero me atraía mucho el hecho de investigar y de buscar cosas. Cuando terminé el colegio y entré a la Facultad en la carrera de química, empecé a ver que lo que más me gustaba no era la parte rutinaria del trabajo de un químico, en una empresa o una fábrica, sino el desarrollo, el poder generar ideas nuevas. De hecho, empecé a trabajar en una empresa, y al poco tiempo renuncié porque se me dio la oportunidad de entrar a trabajar en la Facultad de Ciencias. La decisión fue inmediata. Tengo además un gran cariño por la docencia. No concibo el trabajo de investigación sin la docencia, ni la docencia sin la investigación.

#### ***QV. ¿Cuál fue el tema de su tesis de doctorado?***

EC. Mi directora fue la doctora Elena Llambías, y también colaboró mucho uno de los creadores del departamento de Química Biológica, el doctor Moisés Grinstein, que tuvo una participación importante en el desarrollo de la tesis. El tema fue el que más interesaba en aquel momento a los recién graduados en el área de Química Biológica: el estudio del metabolismo de las porfirinas y su relación con ciertas enfermedades conocidas como porfirias. El tema que me dio la doctora Llambías era el estudio de una de las enzimas involucradas en el metabolismo del hemo [el núcleo activo de las proteínas transportadoras de oxígeno, que tiene un átomo de hierro en el centro de un anillo de porfirina]. Luego, con el doctor Grinstein empezamos a desarrollar una segunda parte de la tesis, más dedicada a la biología molecular, que consistía en ver cómo se regulaba ese mecanismo.

***QV. ¿En qué año se doctoró?***

EC. En 1987. En ese momento, empezamos a hacer algunas cosas de biología molecular, que aquí no se hacían, así que nos costó bastante poner a punto la metodología. En 1999, ya tenía un grupo propio y había accedido a un cargo de profesor; iniciamos entonces una nueva línea que es la regulación del ciclo celular, y continuamos también con aspectos de la regulación metabólica en eucariotas superiores: ratas, ratones y cultivos celulares humanos.

***QV. En su opinión, ¿cuáles son los puntos fuertes del Departamento, y cuáles los puntos débiles? Cómo podrían destacarse los fuertes y mejorarse las debilidades?***

EC. El Departamento posee un desarrollo importante en las áreas de virología y genética bacteriana, y un desarrollo incipiente, pero importante, en bioquímica y biología molecular y fisiología. Pero también hay deficiencias: me parece que el nivel de investigación ha quedado un poco relegado, y una de las cosas que veo es una división muy estricta por áreas, lo cual tal vez en su momento fue beneficioso para el desarrollo de ciertas temáticas, como las de toxicología y microbiología. Una deficiencia que veo es que hay muy poca integración entre los grupos. Hay grupos muy valiosos y que tienen un potencial importante, pero la falta de integración entre ellos trae aparejado un desperdicio de recursos humanos y materiales. Y no se piensa en complementarlos, sobre todo a la hora de hacer pedidos de subsidios. Por eso, una de las cosas que quisiera lograr en este período en que voy a estar como director es fomentar la integración, que es un reclamo general.

***QV. ¿Hay algún otro punto fuerte del Departamento que quiera destacar?***

EC. Sí, además de esas áreas que mencioné, hay que destacar que el Departamento cuenta con una camada de investigadores de mediana edad muy productivos, con mucha pujanza y un número de becarios con muchas ganas de trabajar. Apuesto mucho al componente humano del Departamento.

***QV. ¿Qué acciones deben tomarse para fomentar esa integración entre los grupos?***

EC. Lo primero es una toma de conciencia de las ventajas que podrían obtenerse al lograr esa interacción. Me parece importante continuar con la organización de jornadas o seminarios en los cuales se exponen las líneas y los distintos avances y experimentos de cada grupo. Otra, me parece, es fomentar que en los pedidos de subsidios haya comunicación entre los grupos y no haya superposición. La idea es sumar esfuerzos. Los subsidios más importantes, que son los de la Agencia, sirven para insumos, pero no llegan a ser un monto significativo como para comprar un equipo de mediano para arriba. Pero, si se reúnen varios grupos, se podría lograr reunir una cantidad suficiente como para acceder a la compra de alguno de esos equipos.

***QV. Tal vez se mantuvo la organización que tuvo el departamento en sus inicios y eso no se ha ido adaptando a los tiempos que corren.***

EC. Sí, justamente, prevaleció la estructura de un departamento creado hace más de cuarenta años, que en su momento seguramente sirvió y fue muy importante. Pero esa rigidez, ahora, no permite que haya una actualización e impide tener una mirada más moderna.

***QV. Usted formó parte, durante mucho tiempo, del Consejo Departamental (Codep). En tal sentido, ¿cómo se decidió a postularse para la dirección?***

EC. A mí siempre me gustó participar en las organizaciones donde trabajo, me atrae la política, que para mí es una buena palabra, no una mala palabra. Después de muchos años participando en el Codep y, en general, con una postura crítica respecto del manejo del Departamento, me pareció que era la hora de probar y ver si podía poner en práctica las ideas que tenía.

***QV. ¿Cómo hace para compatibilizar la tarea de dirección con la docencia y la investigación?***

EC. Ayuda el hecho de que mi hijo ya sea grande y no demande tanto tiempo como antes. Realmente me dedico mucho tiempo, unas 60 horas semanales, y trabajo también muchos sábados y domingos. Entre investigación y dirección me insume unas doce horas por día. Pero lo hago realmente con gusto.

***QV. ¿Cómo afecta al Departamento la disolución de los departamentos docentes de los institutos?***

EC. El Departamento docente del Instituto de Investigaciones Bioquímicas (hoy Instituto Leloir), hasta los primeros años de la recuperación de la democracia, estaba incluido en el departamento de Química Biológica. Pero los propios investigadores del Instituto pidieron formar un ente aparte, lo cual se concretó cuando volvió la democracia y, con ella, la autonomía universitaria. En ese momento fue una pérdida para el Departamento, más que nada por el malgasto y el mal uso de recursos, pues se dividió en dos algo para hacer más o menos lo mismo. De hecho, había muchas temáticas comunes,

que estaban duplicadas. Creo que ahora esta integración, si bien los investigadores del Instituto lo sienten como una pérdida, es beneficiosa para el Departamento, porque se recuperan investigadores y docentes de alta calidad, además de servir para aunar esfuerzos. Y lo que veo, en estas primeras semanas desde el 1 de marzo, es que los docentes incorporados están bastante integrados, y con mucha voluntad de colaborar con el Departamento y participar como miembros plenos, que lo son.

***QV. ¿Qué pasa cuando un departamento de química tiene la mayoría de sus alumnos pertenecientes a la carrera de biología? ¿Cuál es el lugar del departamento dentro de ese esquema?***

EC. Cuando asumí, en la primera reunión, dije, como opinión personal, que el Departamento había perdido identidad y peso específico dentro de los departamentos de la Facultad. Precisamente porque no era ni un departamento de biología ni un departamento de química. Por ello creo que nuestro lugar es como un departamento de química, y pese a tener la mayor cantidad de alumnos de biología, las materias que dictamos deben tener una perspectiva química. Si no, estamos navegando entre ser un departamento de biología y uno de química. Y muchas veces los departamentos de química se olvidan de nosotros, por ejemplo, organizan olimpiadas de química y no se invita al departamento de Química Biológica porque se lo ha perdido como departamento de química. Y desde la biología tampoco es tomado en cuenta. Tenemos que recuperar la identidad química, pero servir de nexo entre los de química y de biología, que podamos dar una formación para ambas carreras.

***QV. ¿Las comisiones curriculares, por ejemplo, cómo deberían estar formadas? En el caso de biología, hay una comisión de carrera, y sus miembros son del departamento de biología.***

EC. Yo creo que el departamento de Química Biológica tendría que tener, no sé si voto (pues no admitiríamos que un biólogo decidiera acerca de la carrera de química) pero podría tener voz y ser consultado en la carrera de biología. Porque es el departamento que naturalmente tiene que complementar esa parte que a los biólogos les va a faltar.

***QV. Es decir, habría que tratar de pasar de la invisibilidad al nexo.***

EC. Creo que para eso tendríamos que recuperar el prestigio que tenía este Departamento, que ahora está un poco devaluado.

***QV. ¿Desde qué punto de vista está devaluado?***

EC. Sobre todo, desde el punto de vista de la investigación, que también se refleja en la parte docente. Tal vez la comparación con el FBMC (Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular) es natural, por la temática. El departamento está en un pie de igualdad en la parte docente, y

sin embargo, el mayor prestigio científico que tiene el FBMC opaca la actividad de nuestro departamento.

***QV. Parecería haber poca integración entre los diferentes departamentos, ¿esa situación se puede revertir?***

EC. La Facultad parece como una federación de departamentos, en la cual cada uno hace lo que le parece y no hay conexión entre ellos. Pienso que la Facultad tendría que incentivar una mayor conexión entre departamentos. El Departamento de Química Biológica está dispuesto a realizar materias con participación de otros departamentos. Pero la Facultad, hasta ahora, ha permanecido en una posición neutral y no ha intervenido para tratar de cambiar la situación.

***QV. Química Biológica es uno de los departamentos más interdisciplinarios.***

EC. Sí, con los tres departamentos en que se dividió biología y con los tres departamentos de química tenemos una relación muy estrecha. Pero hay mucha competencia por los alumnos, se busca atraerlos para cada departamento, sin pensar en la formación. Cuantos más alumnos se tengan, es posible obtener más cargos. Es un pensamiento de supervivencia, no de mejoramiento. La Facultad, con bastante razón, está analizando cómo están distribuidos los cargos docentes en cada departamento, pero lo hace sobre la base, casi exclusiva, del número de alumnos. Cuantos más alumnos tiene un departamento, más cargos justifica. Entonces, se ha desatado desde hace unos cuatro años una competencia feroz, aunque encubierta, por dar materias que atraigan alumnos, y como el botín principal son los biólogos, con casi el 50 por ciento de la matrícula, hay un interés de todos por captar más alumnos biólogos, y así se pierde el objetivo. Parecería que el fin es sólo la supervivencia.

***QV. ¿Como ve el hecho de que hubiera una materia de grado, optativa, sobre comunicación de la ciencia?***

EC. Estoy absolutamente de acuerdo. Tendría que ser algo optativo, por supuesto, pero es algo que puede ayudar a los alumnos, les daría otra visión. Además, es formar recursos humanos en una actividad que es totalmente necesaria, como la divulgación de la ciencia. De hecho, la ciencia tiene que terminar obligatoriamente en la publicación, para que los demás conozcan el trabajo propio, si no, no sirve para nada. Y también, aunque no con el mismo rigor, se tiene que dar a conocer al gran público. No para beneficio de la ciencia ni para obtener recursos, sino porque la sociedad merece conocer, en términos sencillos, en qué se gastan los recursos que pone. Así que estoy totalmente de acuerdo.

***QV. ¿A la hora de un concurso docente, por ejemplo, se debería dar un reconocimiento mayor a la tarea de divulgación de la ciencia que pueda desarrollar un docente investigador?***

EC. Obviamente no le daría el mismo peso que a una publicación científica, pero es una actividad valiosa que lleva su tiempo y debe ser reconocida absolutamente.

***QV. Teniendo en cuenta que una de las características del departamento es una amplia oferta de cursos de postgrado, tal vez más importante que en otros departamentos, ¿cómo ve la relación entre docencia e investigación en el departamento?***

EC. La oferta docente del departamento, tanto de grado como de postgrado, es tenida en cuenta, lo sabemos por las encuestas, por comentarios, por los mismos alumnos que vienen muy dispuestos a cursar materias de este departamento, que son muy bien evaluadas en general, así como los cursos de postgrado. Todo esto está avalado por un número importante de grupos del departamento que tienen un muy buen nivel científico, que además de hacer docencia de grado de buena calidad, también pueden ofrecer cursos de postgrado nuevos, que se van renovando año a año.

***QV. ¿Cómo se puede mejorar el nivel del departamento?***

EC. Una de las cosas que nos hemos propuesto en la dirección para este período es crear una conciencia de evaluación de la tarea científica en el departamento. Creemos que esa rigidez en la estructura de las áreas y esa incomunicación entre los distintos grupos de la que hablamos antes hizo que cada uno funcionara en forma independiente del consenso departamental. Entonces hay que instalar una conciencia de que la actividad científica del departamento tiene que ser evaluada y que los recursos del departamento tienen que ser otorgados del mismo modo en que se hace en instituciones como el Conicet, la UBA o la Agencia, según los antecedentes y la producción de los investigadores. Aquí también, los recursos del departamento, como el espacio y el equipamiento deben ser distribuidos en relación con la producción de los distintos grupos.

***QV. ¿Cómo se hará esa evaluación?***

EC. La idea es crear una comisión externa, formada por investigadores relevantes de otras instituciones del país, por ejemplo de Córdoba o de Rosario, y organizar una visita de dos o tres días, para que observen y hagan una evaluación del desarrollo de la investigación de los distintos grupos del departamento. Y además que se haga una evaluación del departamento en términos de áreas de vacancia y temáticas superpuestas. Que den una opinión global del departamento y también una opinión individual de cada grupo. La idea es que los recursos del departamento sean repartidos u otorgados de acuerdo con esa evaluación. Primero, el departamento debería definir qué áreas quiere desarrollar y qué áreas no necesitan aumentar su tamaño, y realizar concursos abiertos para llenar esas áreas de vacancia, donde podrían ingresar grupos nuevos, o los investigadores jóvenes adquirir autonomía y pasar a formar grupos independientes. Eso hasta ahora se hace sin tener en cuenta los

antecedentes de cada uno. En decir, la idea es hacer concursos abiertos para repartir los espacios y los recursos.

***QV. ¿Cuál sería el parámetro principal de esa evaluación de los grupos, el número de publicaciones?***

EC. El parámetro tendría que ser la producción científica, es decir, las publicaciones, los subsidios recibidos, los recursos humanos formados y también la docencia. Si bien la idea es evaluar la actividad científica, la docencia también debería ser considerada, principalmente porque resta tiempo a la investigación. Debería ser tomada en cuenta a la hora de ver si un investigador pudo dar todo su rendimiento científico, o no, y en qué proporción ello se debió a que dedicó mucho esfuerzo a la docencia.

***QV. Las encuestas sobre el desempeño docente que completan los alumnos, ¿son tenidas en cuenta en el Departamento?***

EC. Nosotros, tanto en la dirección como en el Codep, analizamos esas encuestas, que son una guía importante. Si vemos algo grave o importante, tratamos de hablar con el docente. Pero no tienen mucha aplicación efectiva. En los concursos docentes, el reglamento deja en manos del jurado la decisión de aplicar o no los resultados de las encuestas. Creo que todos, en nuestra tarea, tenemos que saber que estamos evaluados o supervisados. En cualquier empresa es así, y por qué no en la universidad, donde manejamos recursos que son de la sociedad.



## Las versátiles proteínas *zinc fingers*

Cybele C. García\*

Laboratorio de Virología. Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Ciudad Universitaria. Pabellón 2. Piso 4. C1428EGA. Capital Federal. Argentina.

*Recibido: 21/03/2006.*

*Aceptado: 27/03/2006*

### Resumen

Los dominios *zinc fingers* son elementos estructurales muy estables cuya particularidad es la coordinación de uno o más átomos de zinc a través de residuos de cisteínas e histidinas. Los *zinc fingers* son uno de los motivos más encontrados en las proteínas, y esto es de gran relevancia ya que por medio de los mismos participan en interacciones específicas con distintas macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos). Teniendo en cuenta las características de estas estructuras, y la variedad de funciones que cumplen, muchos grupos de investigación se dedican hoy a utilizar estos motivos para estudiar interacciones entre macromoléculas o como herramientas en biología molecular.

*Palabras clave: dominios estructurales, dedos de zinc, zinc fingers, interacciones proteína-DNA, interacciones proteína-proteína*

### Abstract

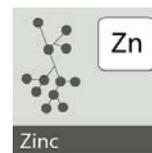
The zinc finger domain is a very stable structural element whose hallmark is the coordination of a zinc atom by several amino acid residues, usually cysteines and histidines. These structural elements are associated with protein-nucleic acid recognition as well as protein-protein interactions. Zinc finger proteins have fascinated many research groups because of their modular assembly and broad range of biological functions. One can logically construct zinc finger proteins that bind virtually any gene in any cell. Thus, the zinc fingers proteins represent novel and promising tools in the field of biomedical research.

*Key words: structural domains, zinc fingers, DNA binding, protein-protein interactions*

### El zinc, un metal más que esencial

La concentración intracelular de iones metálicos, así como su distribución en los distintos compartimientos celulares, está estrictamente controlada. Estos iones juegan un papel crucial en la mayoría de los procesos bioquímicos, por lo que un balance equilibrado y apropiado de los mismos es absolutamente necesario para un fenotipo celular saludable.

En particular, el ión zinc es el segundo ión metálico encontrado en organismos vivientes luego del hierro, y en contraste con otros iones metálicos, el zinc (II) no sufre reacciones de óxido-reducción gracias a que su orbital  $d$  se encuentra completo, lo que lo hace sumamente estable, teniendo dos funciones esenciales posibles en la naturaleza: catalítica o estructural.



En el plano estructural, la secuencia de residuos aminoacídicos en una proteína está dividida en distintas subsecuencias, las cuales constituyen una región, estructura o componente independiente. Estos son los llamados “motivos o dominios”. El ión zinc es el componente principal de uno de los motivos más comúnmente hallados en las proteínas: los dedos de zinc o motivos *zinc fingers*.

El término *zinc finger* se aplica a un diverso grupo de motivos proteicos que poseen en común la propiedad de unir átomos de zinc con el fin de estabilizar su estructura. Estos motivos fueron caracterizados por primera vez en el laboratorio de Aaron Klug en 1985, hace más de dos décadas, cuando el descubrimiento de estos mini-dominios en el factor transcripcional IIIA de *Xenopus laevis*, revolucionó la biología celular estructural.



Fig. 1. Una proteína interactúa con el DNA a través de su motivo zinc finger.

Hoy se sabe que los *zinc fingers* son uno de los motivos estructurales más encontrados en las proteínas, y esto es de gran relevancia ya que casi todos los procesos biológicos involucran interacciones específicas entre los dominios estructurales presentes en las distintas macromoléculas (proteínas y ácidos nucleicos).

### Los motivos *zinc fingers* son muy abundantes

Los *zinc fingers* constituyen el segundo motivo estructural encontrado en proteínas humanas. Es el más común hallado en las proteínas de las moscas, y es relativamente muy común en muchos otros organismos. De los aproximadamente 30.000 genes humanos, cerca de 3.000 codifican para proteínas que contienen motivos *zinc fingers*, lo que representa más de 15.000 de estos motivos recorriendo nuestro cuerpo en todo momento. Además, existen proteínas que contienen, a lo largo de su secuencia, hasta 37 *zinc fingers* individuales.

En un primer momento, las proteínas *zinc finger* fueron observadas como posibles factores de transcripción, ya que son capaces de interactuar en forma específica con el DNA, por lo cual son llamadas también “proteínas que unen DNA” o “*DNA binding proteins*” (Fig.1). Ya en los 80, fue posible evidenciar cómo ciertas estructuras cristalográficas de proteínas regulatorias se unían a sus secuencias DNA blanco; sin embargo, ya hace unos años se sabe que las proteínas *zinc fingers* llevan a cabo varias funciones en los distintos procesos celulares, como traducción, metabolismo, señalización, uniéndose también a RNA u otras proteínas que presentan estos motivos.

### ¿Cómo reconocer una proteína *zinc finger*?

Las proteínas *zinc fingers* se encuentran dentro del grupo de las llamadas metaloproteínas, debido a que necesitan unir uno o varios iones metálicos, en este caso zinc, para llevar a cabo sus funciones biológicas, regular sus actividades o estabilizar sus estructuras terciarias o cuaternarias.

Los motivos *zinc fingers* forman estructuras únicas muy sólidas, sostenidas en la mayoría de los casos por residuos aminoacídicos de cisteínas (C) e histidinas (H). Estudios experimentales revelan que cuando el zinc es removido del núcleo de estas estructuras, los residuos aminoacídicos interaccionan entre sí formando grandes complejos de proteínas que pierden su funcionalidad, por lo que la asociación coordinada entre la unión del zinc y el correcto plegamiento de la proteína tiene muchísimas consecuencias tanto químicas como biológicas. El estudio de estas asociaciones es de gran importancia para el entendimiento de las funciones de las proteínas que contienen estos motivos, ya que han sido localizadas tanto en el núcleo como en el citoplasma y a través de sus motivos participan en distintos tipos de interacciones esenciales para el adecuado funcionamiento celular.

Hoy en día, los distintos proyectos genómicos han revelado un inmenso número de secuencias primarias proteicas, y pese a que ya hay disponible distintas herramientas bioinformáticas para el análisis proteico, que permiten el alineamiento de miles de secuencias buscando homologías y patrones distinguibles, las propiedades de unión a iones metálicos continúan siendo difíciles de predecir o evidenciar experimentalmente. Uno de los problemas típicos en la determinación y detección de la asociación de una metaloproteína no caracterizada al ión metálico, es que durante su purificación la misma generalmente pierde el metal o se une a otros metales espurios.

Siendo el zinc uno de los metales más comunes de nuestra dieta, podemos suponer que fue algo totalmente fortuito que las proteínas lo incorporaran como parte de su estructura, quizás no sea el zinc el metal natural, quizás sea cadmio, cobalto, hierro...nosotros en realidad no sabemos si el 95 % de las proteínas *zinc fingers* en verdad poseen el zinc en su estructura, sólo suponemos que poseen zinc basándonos en su secuencias.

Cabe destacar que existen también proteínas que contienen zinc (incluyendo muchas enzimas) que no son consideradas proteínas *zinc fingers*, debido a que la región que se une al DNA constituye sólo una pequeña parte de un gran dominio estructural, y no son un módulo autónomo discreto, por lo que no constituyen un dominio estructural independiente.

La estructura de cada motivo *zinc finger* individual es sumamente conservada y consiste en aproximadamente entre 30 a 60 residuos, constituidos todos por plegamientos  $\beta\beta\alpha$  (2 láminas  $\beta$  antiparalelas y una  $\alpha$ -hélice), sostenidos y ensamblados por el átomo de zinc.

Las láminas  $\beta$  se encuentran en la región Nterminal, mientras que la  $\alpha$ -hélice se encuentra en la C-terminal del motivo. En medio de las cisteínas e histidinas se encuentran los residuos que forman el dedo (*finger*) que une al DNA.

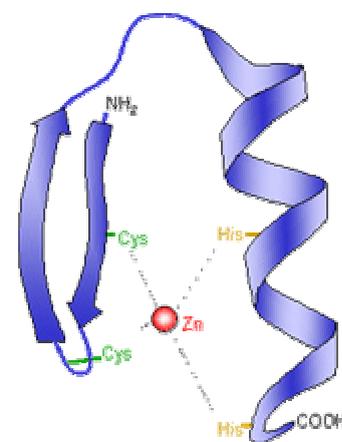


Fig. 2. Plegamientos  $\beta\beta\alpha$  de un clásico *zinc finger* C2H2.

Hay por lo menos quince clases diferentes de motivos *zinc fingers* (Fig.3), de acuerdo a como se diferencian en su naturaleza y rearreglo de los residuos que unen los átomos de zinc. Algunos de los más importantes son:

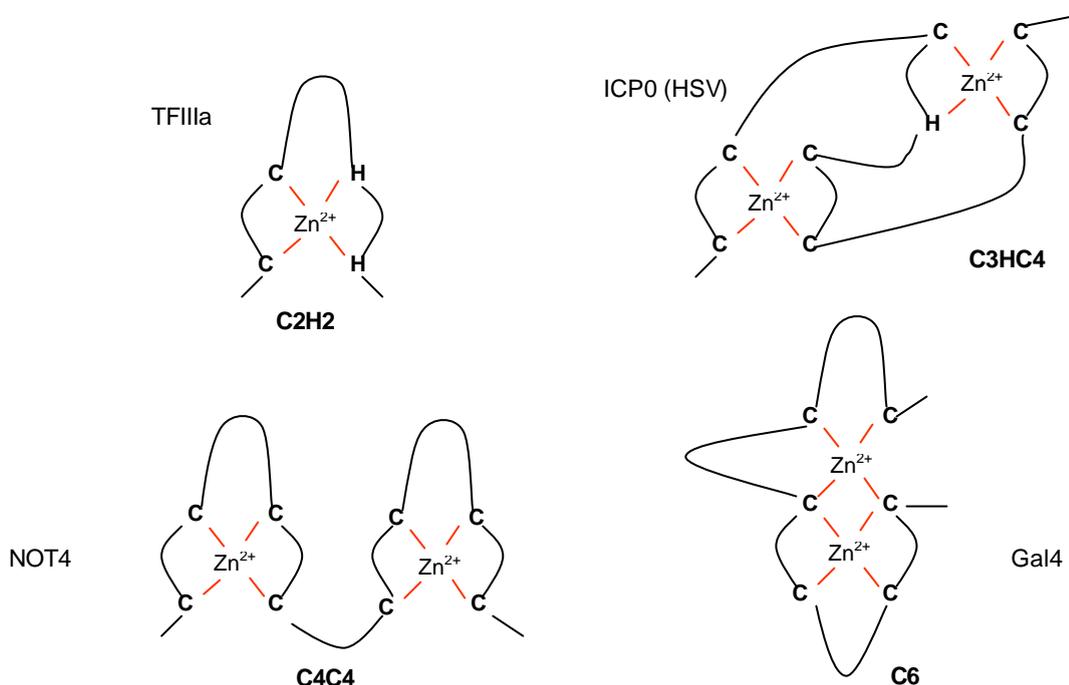


Fig. 3. Esquemas de distintos motivos *zinc fingers*.

**C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>:** las proteínas que portan el clásico motivo *zinc finger* C2H2 comprenden probablemente la mayor familia de proteínas regulatorias en los mamíferos. El *zinc finger* C2H2 contiene aproximadamente entre 25-30 residuos aminoacídicos.

A pesar de que la mayoría de las proteínas que contienen los *zinc fingers* C2H2 interactúan con el DNA, otras, sin embargo, también unen RNA o proteínas. Las diferencias en la composición de las secuencias de los dedos y el número y espaciado de los mismos, pueden formar un variado número de distintas secuencias específicas que se unen a diferentes sitios, es decir, es la parte reactiva de la molécula que directamente participa en la combinación específica (DNA, RNA, proteína).

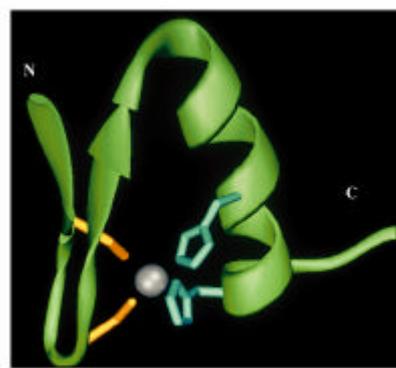
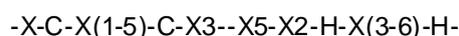


Fig. 4. Motivo *zinc finger* C2H2.

El siguiente patrón describe el motivo:



donde X es cualquier aminoácido, y los números indican cuántos residuos hay entre ellos, la posición en que se encuentre el motivo es importante para que se de un plegamiento correcto y estable del motivo zinc de la proteína que lo presenta. Algunas de las proteínas caracterizadas que presentan

este motivo son: el factor de transcripción TFIIIA de *X. laevis*, el factor de transcripción humano asociado a RNA polimerasa I, Sp1, y el factor de transcripción murino, Zif268.

**C<sub>2</sub>HC:** a través de este motivo las proteínas interactúan con RNA y otras proteínas. Uno de los ejemplos más estudiados es el motivo que presenta la proteína de la nucleocápside NCp7 de los retrovirus. Esta proteína está involucrada en funciones esenciales para la replicación de estos virus como el empaquetamiento del RNA viral.

**C<sub>4</sub> (lazo o cinta):** las proteínas que contienen este motivo son en su mayoría enzimas involucradas en la replicación y transcripción del DNA, como las primasas de los fagos T4 y T7 que presentan motivos C4 reconociendo específicamente tres pares de nucleótidos (5' GTC 3') de una hebra simple de DNA. Por otro lado, los factores TFIIIS y TFIIIB interactúan tanto con DNA simple cadena, como con DNA doble cadena y RNA. La mutación de este motivo pareciera ser suficiente para bloquear el reconocimiento, sin embargo el motivo pudiera no ser el único determinante para la especificidad de estas interacciones.

**C<sub>4</sub> (familia GATA):** la familia GATA incluye factores de transcripción que regulan la expresión de genes en diversos tejidos durante el desarrollo celular. El factor GATA-1 está involucrado en la regulación del desarrollo de los glóbulos rojos y presenta dos *zinc fingers* del tipo C4. El *zinc finger* del extremo C terminal reconoce y se une a la secuencia (A/T)GATA(A/G) del DNA, mientras que el *zinc finger* que se encuentra en el N terminal no se une al DNA, aunque parece modular la unión del C terminal mediante la interacción con otros factores transcripcionales. Los factores GATA-2 y 3 tienen una gran capacidad de unión a la secuencia GATC del DNA mediante sus motivos C4 y juegan papeles importantísimos en la hematopoesis.

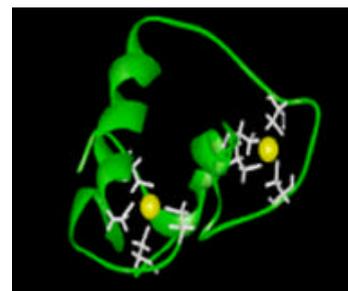


Fig. 5. Motivo *zinc finger* C4 GATA.

**C<sub>6</sub>:** la proteína más estudiada que presenta este motivo es la GAL4 de las levaduras; esta proteína activa la transcripción de genes involucrados en la utilización de la galactosa y la melibiosa, y es un monómero en ausencia de DNA, sin embargo se une a una secuencia de 17 pares de bases del DNA en forma de dímero.

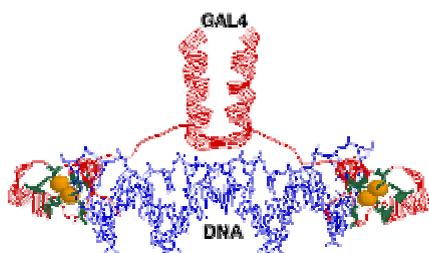


Fig. 6. Organización del dominio C6 de Gal4. Como muchos otros factores de transcripción Gal4 forma un dímero para interactuar con el DNA. En cada Gal4, 6 residuos de cisteínas unen 2 átomos de zinc.

**C<sub>8</sub>:** este motivo está presente en varios receptores intracelulares proteicos como el estrógeno, glucocorticoides, y receptores retinoicos. Los residuos que conforman el motivo se unen a dos

secuencias de DNA de 6 pares de bases que constituyen el elemento de respuesta hormonal. La unión al DNA requiere la dimerización del motivo C8.

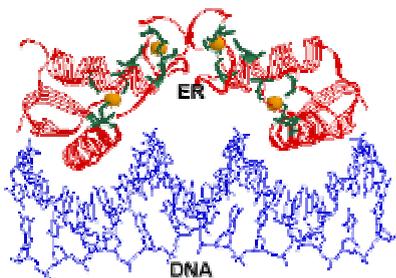
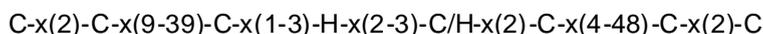


Fig. 7. Organización estructural del dominio C8 del receptor proteico de estrógeno (ER). Se puede observar cómo se forma un dímero del receptor para así unirse al DNA. Cada ER está unido a 2 átomos de zinc. La mayoría de los receptores de hormonas esteroideas poseen la misma estructura C8.

**RING fingers (C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> - C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>C<sub>3</sub>):** el motivo RING finger es un *zinc finger* particular que reúne dos subtipos denominados C<sub>3</sub>HC<sub>4</sub> (RING-HC) y C<sub>3</sub>H<sub>2</sub>C<sub>3</sub> (RING-H<sub>2</sub>). Un análisis fino adicional fue llevado a cabo y el patrón que se observó fue:



El motivo *RING* está presente en numerosas proteínas animales y vegetales. Son ocho los residuos que unen los dos átomos de zinc en este motivo particular, y curiosamente las secuencias que contiene este motivo se encuentran superpuestas, siendo el primer, segundo, quinto y sexto residuo el que coordina un átomo de zinc, mientras que el tercer, cuarto, séptimo y octavo residuo, unen el segundo átomo de zinc. En este grupo se encuentran proteínas de diversos orígenes como: Rad5, involucrada en la reparación del DNA de levaduras, la proteína humana RAG1, esencial para el rearrreglo en las inmunoglobulinas, el péptido del gen 63 del virus herpes equino tipo 1, la proteína Z de los arenavirus y la proteína humana de la leucemia promielocítica PML.

**H<sub>2</sub>C<sub>2</sub> finger:** el dominio H<sub>2</sub>C<sub>2</sub> se encuentra altamente conservado en las integrasas de los retrovirus y los retrotransposones. La comparación de varias integrasas sugiere que este dominio constituye un nuevo grupo de motivos *zinc fingers*. Estos dominios al unirse a su molécula blanco, cambian la conformación de la proteína.

**El dominio LIM:** constituye un motivo *zinc finger* "doble", y se lo encuentra en una gran variedad de proteínas como factores transcripcionales, quinasas y proteínas involucradas en la organización del citoesqueleto, desarrollo de órganos y linaje celular.

### Proteínas *zinc fingers* a medida

Como ya se mencionó anteriormente, lo más importante de las pequeñas estructuras zinc fingers es que son sumamente estables con una conformación tridimensional sólida.

Teniendo en cuenta las características de estas estructuras, y la variedad de funciones que cumplen, muchos grupos de investigación se dedican hoy a utilizar estos motivos para estudiar interacciones entre macromoléculas o como herramientas para realizar experimentos que uno desee.

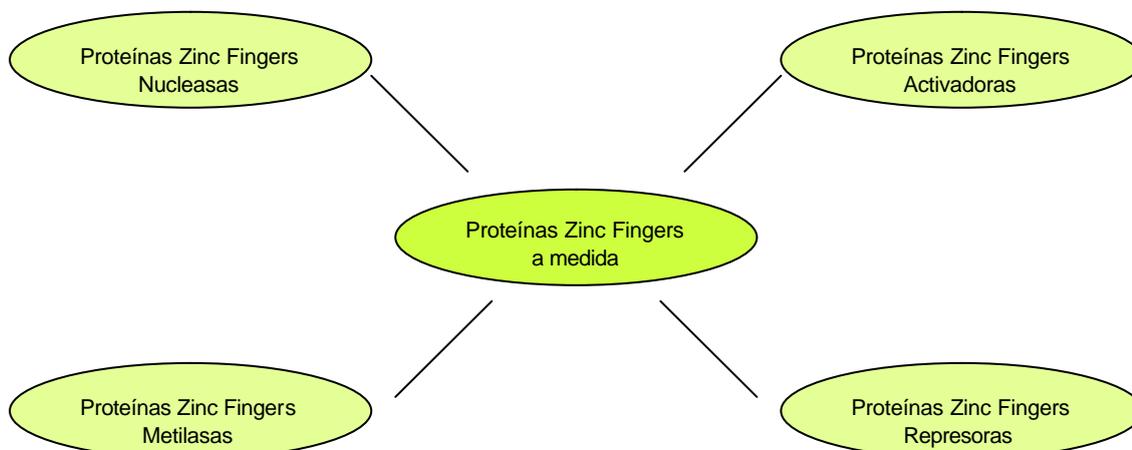
Desde ya hace unos años, los investigadores diseñan sus propios dominios *zinc fingers*, creando nuevos motivos de forma tal que interactúen con algo que uno quiera, y no lo hagan con los que la naturaleza ha diseñado para interactuar. Se diseñan así, *zinc fingers* para interactuar con una proteína, una secuencia de DNA, o incluso una secuencia de RNA específica, es decir, cualquier blanco que pueda ser útil para la medicina, o tal vez sólo para estudiar y probar la función de una proteína encontrada en un determinado organismo.

Podemos pensar, por ejemplo, en tomar una estructura *zinc finger* como modelo, que sea pequeña, estable, compacta, y pasarla por una serie de modelados. Podemos diseñarle a la proteína una nueva superficie, con estos nuevos aminoácidos en la superficie, será capaz de interactuar con nuevas proteínas, proteínas que poseen determinadas funciones, que uno quiera interferir o intensificar, pero... ¿se puede hacer esto?

Esto no es un nuevo concepto, ya que básicamente los anticuerpos han estado haciendo esto desde hace ya un largo tiempo. Cuando uno piensa en una estructura típica de un anticuerpo, es básicamente un esqueleto que no hace verdaderamente mucho, más que estar “ahí”, y cambiar su conformación para poder interactuar con su blanco. Tenemos cientos de miles de anticuerpos distintos recorriendo nuestro cuerpo. Son sólo unos pocos aminoácidos diferentes entre los distintos anticuerpos los que permiten los distintos reconocimientos de los diferentes blancos. En este momento hay muchísimos anticuerpos que están siendo probados en la clínica como agentes terapéuticos. El problema de usar los anticuerpos como drogas es que son muy buenos para bloquear o interactuar con blancos en la superficie celular, pero no son buenos para actuar con blancos dentro de la célula, ya que contienen puentes disulfuros, los cuáles no son estables dentro de la célula, y además por su gran tamaño, y no es fácil introducirlos a través de la membrana celular.

Por el contrario, los motivos *zinc fingers*, son muchísimo más pequeños, y son muy estables dentro de las células, ya que más de 15.000 se encuentran en proteínas intracelulares. Estas propiedades hacen que los *zinc fingers* puedan ser vistos como potenciales drogas.

Las proteínas *zinc fingers* pueden ser diseñadas por ingeniería genética para unir, eventualmente, cualquier secuencia de DNA y cumplir distintas funciones.



Los dominios pueden contener 3, 4 ó 6 *zinc fingers*, y reconocer 9, 12 ó 18 pares de bases de DNA, respectivamente. Estos factores de transcripción artificiales conteniendo múltiples motivos *zinc fingers* o *polydactyl zinc fingers* (PZF) pueden unir la secuencia de DNA que uno desee, y si estos motivos están a su vez fusionados con un dominio activador o represor, o con secuencias correspondientes a metilasas o nucleasas, se transforman en increíbles herramientas para ser utilizadas en biología molecular. Es así como es posible regular cualquier gen, en cualquier tipo de organismo, para el cual su secuencia genómica ya haya sido obtenida. Los dominios PZF son contruídos generalmente usando módulos de motivos *zinc fingers* de tipo C2H2.

### **Zinc fingers patogénicos**

Muchas de las proteínas que presentan motivos *zinc fingers* en sus secuencias pertenecen a las bacterias, hongos y virus más peligrosos para la salud humana, patógenos para los cuales no existe todavía ningún tipo de tratamiento efectivo.

Estos microorganismos dependen absolutamente de estas proteínas *zinc fingers* para llevar a cabo su proliferación. Una mutación en los motivos *zinc fingers* lleva a la desestabilización de la estructura proteica que lo contiene, por lo que la conservación de los mismos es esencial para la supervivencia del agente patógeno. Se ha observado que el riguroso consenso de los motivos *zinc fingers* se extiende a las distintas cepas de un mismo patógeno, por lo que ha convertido a estos motivos estructurales en el blanco preferido de los investigadores que intentan combatir los agentes biológicos más amenazantes.

### **Compuestos reactivos contra motivos *zinc fingers*: ¿futuros antivirales?**

En el campo antiviral, en los últimos años se han descrito péptidos antivirales que compiten con el motivo *zinc finger* de la proteína M1 del virus Influenza, y se han reportado numerosos estudios con diversos agentes químicos reactivos contra motivos *zinc fingers* que inhiben la replicación del HIV, actuando sobre el motivo C2H2 de la proteína de la nucleocápside retroviral p7.

Estos agentes, que incluyen compuestos con diversos grupos químicos funcionales, modifican covalentemente las interacciones entre los átomos de zinc y las cisteínas tioladas de los motivos *zinc fingers*, provocando la eyección del átomo de zinc, la consecuente pérdida de la estructura nativa de la proteína y finalmente la interrupción de la replicación viral.

En los arenavirus se ha demostrado que hay dos proteínas con capacidad de unir zinc: la proteína NP y la proteína Z. La NP tiene un dominio *zinc finger* CHC2 en su extremo C-terminal, a través del cual se asociaría íntimamente al RNA viral, mientras que la proteína Z posee un dominio RING del tipo C3HC4.

En nuestro laboratorio hemos estado utilizando compuestos sintéticos que interaccionan con motivos *zinc fingers*, en este caso para bloquear la proteína Z de los arenavirus. Los resultados demuestran que sólo pocos de cientos de compuestos interaccionan específicamente con el motivo RING de esta proteína. Sin embargo, las drogas seleccionadas establecen interacciones muy estables que hace que sean herramientas útiles para estudiar la función de esta proteína dentro del ciclo de replicación viral, además de ser promisorios compuestos de potencial uso terapéutico en

humanos, ya que no existen hasta el momento antivirales disponibles para contrarrestar la fiebre hemorrágica causada por los arenavirus.

### **El poderoso antiviral murino ZAP**

El factor antiviral ZAP (*zinc finger antiviral protein*) es una proteína celular murina recientemente aislada que presenta actividad natural antiviral contra algunos virus como el retrovirus Moloney de la leucemia murina, Sindbis, Semliki Forest, Ross River, herpes zoster y el virus de la encefalitis equina venezolana. Se ha demostrado que células que expresan la proteína ZAP son resistentes a la infección por estos virus. Se ha observado que el poder antiviral de esta proteína radica en su extremo N terminal donde se encuentran cuatro motivos *zinc fingers*, ya que mutaciones en el extremo N terminal de esta proteína llevan a la pérdida de su efecto antiviral. En particular, se sabe que su motivo C3H, es el responsable de unir específicamente el RNA viral, bloqueando su acumulación en el citoplasma celular e impidiendo los sucesivos ciclos virales de replicación viral.

Este descubrimiento reciente es de gran relevancia en el campo antiviral, y demuestra la importancia de la interacción de proteínas celulares con estructuras virales, en este caso RNA, para contrarrestar la eventual infección de diversos patógenos. Sin embargo la acción de ZAP no es de amplio espectro ya que se ha observado que el virus herpes simplex tipo1, el virus polio, el virus de la estomatitis vesicular y el virus de la fiebre amarilla replican normalmente en células que sobre expresan este factor antiviral, por lo que quedan aún muchas preguntas sin respuestas con respecto a la acción de ZAP.

### **Conclusiones**

La importancia de los motivos *zinc fingers* es indiscutida. Los motivos *zinc fingers* incluyen diversos tipos de estructuras con un denominador común: el requerimiento de zinc para su estabilización. Estos motivos estructurales están involucrados en un amplio rango de actividades biológicas que van desde la unión al DNA (simple y doble cadena), reconocimiento del RNA y hasta la coordinación de interacciones proteína-proteína. Desde su descubrimiento en los años 80 al presente, pasaron de ser simples motivos estructurales a ser poderosas herramientas y blancos de acción tanto en la biología molecular como en la medicina, y seguramente la relevancia de estos pequeños motivos seguirá creciendo a medida que descubramos todas sus innumerables funciones.

### **Agradecimientos:**

A la Dra. Elsa B. Damonte, por su crítica revisión del manuscrito.

### **Referencias**

- Alwin S, Gere MB, Guhl E, Effertz K, Barbas CF 3rd, Segal DJ, Weitzman MD, Cathomen T. (2005). Custom zinc-finger nucleases for use in human cells. *Mol Ther.* 12(4):610-7.
- Bick MJ, Carroll JW, Gao G, Goff SP, Rice CM, MacDonald MR. (2003). Expression of the zinc-finger antiviral protein inhibits alphavirus replication. *J Virol.*; 77 (21):11555-62.

- Blancafort P, Segal DJ, Barbas CF 3rd. (2004). Designing transcription factor architectures for drug discovery. *Mol Pharmacol.* 66(6):1361-71
- Dhanasekaran M, Negi S, Sugiura Y. (2006). Designer zinc finger proteins: tools for creating artificial DNA-binding functional proteins. *Acc. Chem. Res.*, 39, 45-52.
- Durai S, Mani M, Kandavelou K, Wu J, Porteus MH, Chandrasegaran S. (2005) Zinc finger nucleases: custom-designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 26;33(18):5978-90.
- Eberhardy SR, Goncalves J, Coelho S, Segal DJ, Berkhout B, Barbas CF 3rd. (2006). Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication with artificial transcription factors targeting the highly conserved primer-binding site. *J Virol.*;80(6):2873-83.
- Gao G, Guo X, Goff SP. (2002). Inhibition of retroviral RNA production by ZAP, a CCCH-type zinc finger protein. *Science*, 6;297(5587):1703-6.
- García, C.C., Candurra, N.A., Damonte, E.B., (2000). Antiviral and virucidal activities against arenaviruses of zinc-finger active compounds. *Antiviral Chem. Chemother.* 11, 231-238.
- García C. C., Djavani M., Topisirovic I., Borden K. L. B., Salvato M. S., Damonte E. B. (2006). Arenavirus Z protein as an antiviral target: virus inactivation and protein oligomerization by zinc finger-reactive compounds. *J Gen Virol* ; 87: 1217-1228
- Gommans WM, Haisma HJ, Rots MG. (2005). Engineering zinc finger protein transcription factors: the therapeutic relevance of switching endogenous gene expression on or off at command. *J Mol Biol.* 2;354(3):507-19.
- Guo X, Carroll JW, Macdonald MR, Goff SP, Gao G. (2004). The zinc finger antiviral protein directly binds to specific viral mRNAs through the CCCH zinc finger motifs. *J Virol.*; 78 (23):12781 - 7.
- Klug A. (2005). Towards therapeutic applications of engineered zinc finger proteins. *FEBS Lett.* 7;579(4):892-4.
- Klug A, Schwabe JW. (1995). Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB J.* 9(8):597-604.
- Mani M, Kandavelou K, Dy FJ, Durai S, Chandrasegaran S. (2005). Design, engineering, and characterization of zinc finger nucleases. *Biochem Biophys Res Commun.* 23;335(2):447-57.
- Papworth M, Kolasinska P, Minczuk M. (2006). Designer zinc-finger proteins and their applications. *Gene*17;366:27-38.
- Rice, W.G., Baker, D.C., Schaeffer, C.A., Graham, L., Bu, M., Terpening, S., Clanton, D., Schultz, R., Bader, J.F., Buckheit Jr., R.W., Field, L., Singh, P.K., Turpin, J.A. (1997). Inhibition of multiple phases of human immunodeficiency virus type 1 replication by a dithiane compound that attacks the conserved zinc fingers of retroviral nucleocapsid proteins. *Antimicrob. Agents Chemother.* 41, 419-426.
- Sugiura Y. (2001). Natural and artificial zinc finger proteins. *RIKEN Review No. 35: Focused on New Trends in Bio-Trace Elements Research.*

\* Dra. Cybele C. García

Investigadora asistente de CONICET.

Jefe de Trabajos Prácticos. Área de Microbiología.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. UBA.

[cygarcia@qb.fcen.uba.ar](mailto:cygarcia@qb.fcen.uba.ar)



Revista **QuímicaViva**  
Número 1, año 5, abril 2006  
[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)

## El ratón *nude* (*nu/nu*) como modelo animal de inmunodeficiencia

**Cecilia Carbone\*, Fabricio Maschi.**

Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio. Facultad de Ciencias Veterinarias. Calles 60 y 118 s/n (1900) La Plata.  
Universidad Nacional de La Plata.

Recibido: 15/03/2006

Aceptado: 23/03/2006



La especie animal más utilizada en experimentación científica en la actualidad es el ratón (*Mus musculus*). Esto se debe principalmente no solo a sus características reproductivas, su tamaño y la facilidad de manejo, sino también a que su genoma es totalmente conocido.

Esto último ha permitido el desarrollo de modelos animales que pueden reproducir características específicas o enfermedades del hombre y de los animales convirtiéndose en reactivos biológicos sobre los cuales se pueden extrapolar los resultados de las investigaciones. Actualmente la producción de modelos murinos constituye una de las temáticas de vanguardia dentro de la ciencia de los animales de laboratorio.

En el ratón existen más de 4000 genes que están asignados a localizaciones específicas, muchos de los cuales fueron identificados, debido a que originan mutaciones espontáneas que producen características físicas distintivas. Los ratones mutantes que portan una mutación simple se han convertido en modelos animales importantes para su utilización en la experimentación científica. Una de estas mutaciones espontáneas simples es la denominada *nude* (*nu*). Este alelo mutante homocigoto recesivo pertenece al grupo *linkage* VII del cromosoma 11 y aparece por primera vez en el año 1966 en una colonia exocriada de ratones en un laboratorio en Glasgow, Escocia. Luego, en el año 1968, se descubre que el ratón *nude* homocigoto, además de presentar su fenotipo desnudo o sin pelo,

característica que le dio el nombre a la mutación, carecía de un timo funcional que permanece rudimentario y produce un número reducido de células T maduras por lo cual no rechazan tejidos alo y xenotransplantados. El hecho de que acepten el trasplante de tumores humanos ha sido uno de los descubrimientos más importantes que ha contribuido con el desarrollo de las investigaciones sobre el cáncer, convirtiendo a estos individuos en el primer modelo de animal de experimentación inmunodeficiente.

### **Otras características importantes**

Los ratones heterocigotas (+/*nu*), son fenotípicamente normales e inmunocompetentes, mientras que los homocigotas para el gen *nude* (*nu/nu*) son los inmunocomprometidos. Además de su deficiencia de linfocitos T, tienen un complemento normal de linfocitos B dependientes de la médula ósea, por lo tanto, estos animales se convirtieron en una herramienta excelente para estudiar el papel del timo en la diferenciación linfocitaria y para realizar investigaciones sobre las funciones de las células B, las interacciones con otras células y para estudiar la actividad de células inmunes como las *Natural Killer* (NK) que aparecen en niveles elevados junto con los macrófagos.

Los ratones *nu/nu* si bien muestran un fenotipo desnudo, pueden presentar histológicamente escasos folículos pilosos normales y también algunos pelos finos.

Cabe aclarar que existen varios genes mutantes que producen el fenotipo desnudo: *nude*, *naked*, *hairless*, *rhino*; estos genes mutantes no se deben confundir uno con el otro, por lo cual los términos ratón *nude* y ratón sin pelo no se deben usar indistintamente.

Los roedores inmunodeficientes son modelos indispensables para las investigaciones biomédicas en estudios de oncología, inmunología, enfermedades infecciosas, estudios del sistema inmune, rechazo de tejidos transplantados, infecciones, cáncer y crecimiento de tumores.

### **El ratón *nude* en estudios oncológicos**

El descubrimiento del ratón *nude* fue un punto de inflexión sumamente importante para la investigación del cáncer, debido a que permitió el estudio de los tumores humanos *in vivo*. El primer trasplante exitoso de un tumor maligno humano fue en el año 1969. Se debe considerar que antes de la aparición de la mutación que dio lugar al ratón *nude*, los tumores humanos se transplantaban y crecían en sitios, tales como los abazones de los hámsters.

Dentro de las investigaciones en el campo de la oncología para las cuales se han utilizado estos ratones como modelo se deben resaltar los hallazgos obtenidos en quimioterapia, radioterapia, inmunoterapia, anticuerpos monoclonales, interferones, interleuquinas y pruebas de carcinogenicidad entre otros.

## **Instalaciones y manejo**

### **Producción y mantenimiento**

Por su condición de inmunodeficientes, los ratones *nude* deben obligatoriamente mantenerse en ambientes en los que se hayan instalado barreras sanitarias estrictas. La categoría microbiológica de los *nude* debe ser la de animales SPF (*Specific Pathogen Free*), esto significa que tendrán su flora intestinal normal pero deberán estar libres de todos aquellos microorganismos específicos capaces de causar infecciones.

En condiciones convencionales pueden sobrevivir entre 14 y 30 días. El bienestar de estos animales depende, en gran medida, del sistema de alojamiento que se elija y del diseño y control del ambiente, factores que son críticos para la producción y el mantenimiento del *nude*. Además se deberán tener en cuenta las siguientes recomendaciones:

- 1.- El ambiente físico debe diseñarse y operarse de manera tal que permita establecer controles ambientales estrictos, brindando seguridad y confort a los animales, minimizando las posibilidades de introducción o transmisión de agentes infecciosos. No solamente se los puede mantener en habitaciones acondicionadas con filtros absolutos (HEPA), sino que existe la alternativa de alojarlos en aisladores flexibles, cabinas aisladoras, estantes ventilados o microaisladores.
- 2.- La estabilidad ambiental se logra mediante un buen diseño del sistema de ventilación, del control de la temperatura, de la humedad relativa, y de la velocidad y presión del aire.
- 3.- Las áreas de servicios tienen que funcionar como una barrera efectiva entre los animales y el ambiente exterior. Estas están diseñadas específicamente para el lavado y esterilización de insumos, además se debe contar con un depósito de equipamiento, de alimento y lechos; un área de cuarentena; sala de necropsias; e instalaciones para el tratamiento y eliminación de los desechos.
- 4.- Las cajas, rejas, comederos y bebederos que se utilicen para el alojamiento de los animales deben estar de acuerdo con las normativas internacionales en cuanto a su material, dimensiones y diseño; con el objeto de brindar el máximo confort a los ratones y de facilitar en forma eficiente su limpieza y esterilización.

La instalación de barreras absolutas brindará la seguridad necesaria para evitar contaminaciones. Existe la necesidad de establecer procedimientos para el tratamiento de todos los insumos que se pondrán en contacto con los ratones *nude*.

El alimento debe ser estéril (sometido a autoclave o a irradiación) al igual que el agua de bebida. El ratón desnudo requiere una temperatura más elevada que las cepas tradicionales, se recomienda entre 25 +/- 1° C, y se debe considerar que en caso de alojarlos bajo un flujo laminar de aire continuo necesitarán una temperatura de 28° C para compensar la pérdida de calor corporal.

La humedad relativa se estandarizará entre el 40 y el 60 %, y la ventilación entre 10 y 15 recambios de aire por hora.

Un fotoperíodo uniforme luz/oscuridad de 14–10 horas respectivamente es el adecuado; teniendo en cuenta que se debe evitar una iluminación excesiva provenientes de artefactos fluorescentes.

### **Sistemas de cría**



Las formas más frecuentes que se utilizan para reproducir estos animales son:

#### 1.-Apareamiento de heterocigotas (+/*nu*):

Este tipo de cruzamiento entre hembras y machos heterocigotas permite obtener una filial 1 (F1) en donde el porcentaje entre fenotipos mutantes *nude* y normales, es decir con pelo, sea de 1:3. Debido a que los heterocigotas son inmunocompetentes y su fertilidad es normal; son fáciles de mantener como colonia saludable.

Sin embargo, este sistema tiene dos desventajas:

- a)- La producción de ratones *nu/nu* es baja.
- b)- Los animales de fenotipo normal producidos en este sistema pueden ser +/*nu* ó +/+; estos dos fenotipos no se pueden distinguir excepto por apareamientos o técnicas moleculares.

#### 2.- Apareamiento de hembras heterocigotas *nu/+* con machos homocigotas recesivos *nu/nu*.

Es el sistema reproductivo que más se utiliza debido a que en la F1 el porcentaje de ratones de fenotipo *nude* respecto de los normales es 1:1. Además tiene la ventaja de que todos los ratones normales son heterocigotas.

#### 3.- Apareamiento de homocigotas recesivos *nu/nu*

A veces se pueden reproducir apareando hembras y machos *nu/nu*, pero aunque toda la F1 resulta con fenotipo *nude*, es un tipo de cruzamiento que no es eficiente debido a la baja fertilidad de las hembras homocigotas *nude* y a su capacidad casi nula para amamantar a las crías, de manera tal que es probable que se fracase si se aplica este sistema.

Las colonias de ratones *nude* deben someterse a un programa de controles microbiológicos exhaustivos que permitirán corroborar la ausencia de contaminaciones. Estos incluyen a los animales, el ambiente y a los insumos.

Es indiscutible el importante progreso que se ha producido en el desarrollo de las investigaciones en las cuales se ha usado como modelo animal al ratón *nude*. El papel que cumplen estos animales como modelo de inmunodeficiencia continuará vigente en las investigaciones biomédicas, especialmente en aquellas enfocadas al tratamiento, prevención, comprensión o estudio del cáncer.

### Referencias

- Scott E. Perkins, Neil S. Lipman. 1995. Characterization and Quantification of Microenvironmental Contaminants in Isolator Cages with a Variety of Contact Beddings. *Contemporary Topics*. Vol. 34. Nº 5. 93 – 97.
- MacDonald, H.R., C. Blanc, R.K. Lees, and B. Sordat. 1986. Abnormal distribution of T-cell subsets in athymic mice. *J. Immunol.* 136:4337-4339.
- Hansen, C.T. 1978. The nude gene and its effects. *The Nude Mouse in Experimental and Clinical Research*, J. Fogh and B. Giovanella, eds. New York: Academic Press. 1-35.
- Fernando J. Benavides, Jean-Louis Guénet. *Manual de Genética de Roedores de Laboratorio, principios básicos y aplicaciones*. Universidad de Alcalá. SECAL. Laboratory Animals Ltd. 2003.
- A. A. Tuffery. *Laboratory Animals, An introduction for experimenters*. Second edition. Wiley & Son. 1995.
- Michael F. W. Festing. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. Churchill Livingstone. 1976. 57 – 73.
- Lela K. Riley. *Development of a Performance Assessment Program for Research Animal Diagnostic Laboratories and Defining Microbiologic Testing Standards*. *Microbial Status and genetic Evaluation of Mice and Rats*. 1999. 7 -13.

### Páginas web:

- <http://users.rcn.com/jkimball.ma.ultranet/BiologyPages/N/NudeMouse.html>
- <http://jaxmice.jax.org/info/bulletin/bulletin06.html>
- <http://www.taconic.com/anmodels/NSWNU.htm>
- [http://en.wikipedia.org/wiki/Nude\\_mouse](http://en.wikipedia.org/wiki/Nude_mouse)
- [http://www.vetmed.ucdavis.edu/Animal\\_Alternatives/cancer.htm](http://www.vetmed.ucdavis.edu/Animal_Alternatives/cancer.htm)
- [http://www.everything2.com/index.pl?node\\_id=1062097](http://www.everything2.com/index.pl?node_id=1062097)
- [http://dels.nas.edu/ilar\\_n/ilarjournal/34\\_1\\_2/34\\_1\\_2NudeMouse.shtml](http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarjournal/34_1_2/34_1_2NudeMouse.shtml)

\* Dra. Cecilia Carbone.

Profesora Titular. Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio.

Facultad de Ciencias Veterinarias.

UNLP.



## Los cultivos transgénicos en la Argentina

Gabriela Levitus\*

Directora Ejecutiva de ArgenBio

(Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología)

Recibido: 17/3/2006

Aceptado: 31/3/2006

Así como la ingeniería genética se emplea para introducir genes en las bacterias para que produzcan insulina, también sirve para incorporar nuevos genes a las plantas con el fin de mejorar los cultivos. El empleo de la ingeniería genética en el mejoramiento vegetal es lo que se denomina agrobiotecnología o biotecnología vegetal. Sus objetivos son diversos, e incluyen el mejoramiento de rasgos agronómicos, la obtención de mejores alimentos, y el aprovechamiento de las plantas como bio-reactores o fábricas de moléculas. Así, podemos distinguir tres “olas” de cultivos transgénicos:

Primera ola: comprende a los cultivos con mejoras agronómicas, como características morfológicas, resistencia a enfermedades y plagas, tolerancia a herbicidas y a condiciones ambientales extremas, como el frío y la sequía. Son ejemplos de la primera ola los cultivos que actualmente se comercializan, como la soja tolerante a herbicida, el maíz y el algodón resistentes a insectos y la papaya resistente a virus.

Segunda ola: corresponde a cultivos que generan alimentos más sanos y nutritivos que los convencionales. Son ejemplos el arroz con alto contenido en vitamina A, papas que absorben menos aceite, maní hipoalergénico, batata con mayor contenido de proteínas y soja con una composición de ácidos grasos más saludable.

Tercera ola: se refiere al empleo de los cultivos como bio-reactores para la producción de medicamentos, vacunas, biopolímeros y otras moléculas de interés industrial. También se incluyen en esta ola a las plantas modificadas genéticamente para remediar suelos contaminados (fitorremediación).

Las variedades transgénicas que se cultivan actualmente pertenecen exclusivamente a la primera ola de transgénicos, es decir, en los que la modificación genética está relacionada con el mejoramiento de rasgos agronómicos. Según el último informe del ISAAA (Servicio para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas), el año pasado 8,5 millones de agricultores de 21 países sembraron 90,0 millones de hectáreas con cultivos transgénicos. Sin embargo, el 98% de esta superficie se concentró en apenas ocho de ellos: Estados Unidos, Argentina, Brasil, Canadá, China,

Paraguay, India y Sudáfrica. Los cultivos genéticamente modificados correspondieron principalmente a variedades de soja, maíz, algodón y canola, y en mucha menor proporción a arroz, papaya y zapallo.

En 2005 la Argentina se mantuvo en el segundo lugar en la lista de productores de transgénicos, sembrando un total de 17,1 millones de hectáreas, un 6% más que el año anterior, y representando el 19% de la superficie global. Prácticamente el 100% de la superficie de soja fue sembrada con soja tolerante al herbicida glifosato, mientras que los maíces resistentes a insectos (Bt) ocuparon el 65% del área cultivada con maíz y el algodón transgénico alcanzó un 60% del total de algodón. De este algodón, la mayor parte correspondió a variedades tolerantes a glifosato, mientras que el algodón Bt se sembró en una superficie menor. En su segunda campaña desde su aprobación, el maíz tolerante a glifosato se sembró en unas 70.000 ha.

La tasa de adopción de cultivos transgénicos es la más alta en lo que se refiere a la incorporación de tecnologías al sector agropecuario argentino. Tal adopción, iniciada en 1996, refleja la satisfacción del agricultor al emplear los productos biotecnológicos, que le permiten, además de disminuir los costos, mayor flexibilidad en el manejo de los cultivos, disminución en el uso de insecticidas, mayores rendimientos y mejor calidad.

La tecnología representada por los cultivos tolerantes a glifosato, en particular la soja, se suma a otras que han revolucionado la agricultura en nuestro país, como la siembra directa (o labranza cero de los suelos) y el uso de fertilizantes. Como la elección de la siembra directa obliga al productor a emplear herbicidas para eliminar las malezas, la combinación semillas transgénicas-glifosato le resulta muy conveniente. En particular, el glifosato es un herbicida muy eficaz y de amplio espectro, y reemplaza a otros herbicidas usados para la soja convencional, que en cambio son muy tóxicos para el ambiente y para quienes trabajan en los cultivos. Si a esto le sumamos la simplificación en el manejo del cultivo y el bajo costo del glifosato, el resultado es una disminución notable en los costos de producción que se refleja en la enorme adopción de estas variedades.

Por su parte, los cultivos resistentes a insectos tienen como objetivo mejorar y simplificar el control de plagas que afectan seriamente a los cultivos, como el barrenador del tallo en el maíz y la oruga del capullo, la oruga de la hoja del algodonero y la lagarta rosada en el algodón. Estas plagas disminuyen el rendimiento de los cultivos y pueden ser devastadoras. Pero en el caso del maíz, además, facilitan la entrada de hongos, cuyas toxinas (micotoxinas) son muy peligrosas para la salud. Es por eso que en el maíz Bt los principales beneficios para el productor son el aumento del rendimiento, la disminución de costos al no usar insecticidas y la mejor calidad del producto. Se ha demostrado además, en nuestro país y en el mundo, que el maíz Bt tiene niveles muchísimo menores de micotoxinas, lo que constituye un beneficio directo para la salud humana y animal. En el caso del algodón, un cultivo que requiere de un rociado intensivo de insecticidas, el uso de variedades Bt disminuyó a un tercio las aplicaciones de estos agroquímicos, lo que es bueno para el ambiente y en quienes trabajan en el campo.

Estos beneficios, sumados a otras ventajas competitivas como los precios internacionales y la situación de crisis que vivió Argentina luego de 2001, explican el por qué de las 17 millones de

hectáreas de transgénicos. Esta expansión provocó un aumento muy importante en la producción y en las exportaciones de granos, harinas y aceites, y también en la generación de empleo. Como resultado, en los últimos años el sector agroalimentario logró posicionarse otra vez como motor de la economía, representando el 45% de producto bruto, el 56% de las exportaciones y el 36% de los empleos del país.

El éxito de la tecnología no se debe sólo a la competitividad económica de los cultivos transgénicos. Apenas surgieron, la Argentina ya estaba técnicamente preparada para recibirlos, adaptarlos y usarlos. Contaba con fitomejoradores de primer nivel que trabajaban activamente en el mejoramiento genético de los cultivos, tanto en empresas semilleras del sector privado como en instituciones públicas. Contaba con productores agropecuarios capacitados e innovadores. Y lo que no es menos importante, se adelantó a los hechos creando en 1991 un sistema regulatorio que garantizó la implementación responsable, en términos de bioseguridad, de cada uno de los cultivos transgénicos liberados al mercado. Este sistema regulatorio, que trabaja en el marco de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación (SAGPyA), le ha servido como modelo a muchos países del mundo que quisieron incorporar esta tecnología.

Mirando al futuro, los cultivos transgénicos que hoy se siembran son apenas la “punta del iceberg” de una cantidad de desarrollos que se están produciendo masivamente en nuestro país y en el mundo. Al menos así lo reflejan las revistas científicas, las noticias y los proyectos de las instituciones públicas y de las empresas biotecnológicas. Se espera en los próximos años la expansión de otros cultivos transgénicos con mejoras agronómicas, como el arroz resistente a insectos, y también la comercialización de algunos productos de la “segunda ola de transgénicos”, como cereales fortificados y aceites más saludables.

\* Dra. Gabriela Levitus

Directora Ejecutiva de ArgenBio (Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología)

Docente del Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular de la FCEyN-UBA y de los Institutos de Tecnología ORT

[glevitus@argenbio.org](mailto:glevitus@argenbio.org)

[www.argenbio.org](http://www.argenbio.org)



Revista **QuímicaViva**  
Número 1, año 5, abril 2006  
[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)



## **Crecimiento, metabolismo y producción de baculovirus en cultivos en suspensión de una línea celular del insecto lepidóptero**

### ***Anticarsia gemmatalis***

Gioria, Verónica Viviana <sup>(1)</sup> ; Beccarfa, Alejandro José<sup>(2)</sup> , Claus, Juan Daniel <sup>(1)</sup> \*

<sup>(1)</sup>Laboratorio de Virología y <sup>(2)</sup>Laboratorio de Fermentaciones, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral, CC 242, (S3000ZAA) Santa Fe, República Argentina

Recibido: 17/03/2006

Aceptado: 24/03/2006

#### **Resumen**

La línea UFL-AG-286, establecida a partir de embriones del insecto lepidóptero *Anticarsia gemmatalis*, podría constituir un sustrato celular adecuado para la producción *in vitro* del virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV), un baculovirus extensamente utilizado como insecticida biológico para controlar la oruga de las leguminosas, una plaga principal de los cultivos de soja. Con el objetivo de caracterizar las propiedades tecnológicas de esta línea celular, y evaluar la factibilidad de su uso para la producción industrial de AgMNPV, las células UFL-AG-286 fueron adaptadas al cultivo en suspensión agitada. En medio TC-100 suplementado con 10% de suero fetal bovino, los cultivos adaptados crecieron con un tiempo de duplicación de 28,9 horas, y alcanzaron una densidad celular máxima de  $3,70 \times 10^6$  células.ml<sup>-1</sup>. La glucosa del medio de cultivo fue consumida casi totalmente, pero sin producción de lactato. Los aminoácidos, con la excepción de glutamina, asparagina, metionina y leucina, fueron consumidos en una muy baja proporción respecto a sus respectivas concentraciones iniciales en el medio de cultivo, o bien incrementaron su concentración. Por otro lado, las células UFL-AG-286 parecen no producir alanina como una vía metabólica para la eliminación de amonio, que se acumula en el sobrenadante de cultivo. La infección sincrónica de los cultivos en suspensión de UFL-AG-286 con AgMNPV durante la fase de crecimiento temprano, que generó altos rendimientos específicos de las dos progenies virales (virus brotados y poliedros), redujo las demandas nutricionales celulares específicas con respecto a los cultivos no infectados.

#### **Palabras clave**

Virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* – Baculovirus – Cultivos celulares en suspensión – Línea de células de insecto lepidóptero – UFL-AG-286

## Abstract

The UFL-AG-286 cell line could be a proper substrate to develop a process for the *in vitro* production of *Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus (AgMNPV), a baculovirus widely used as bioinsecticide. In order to characterize the technological properties of this cell line, and to evaluate their feasibility to be use in the production of AgMNPV, UFL-AG-286 cells were adapted to grow in agitated suspension cultures in spinner-flasks. Batch suspension cultures grew with a doubling time of 28.9 hours, reaching a maximum cell density of  $3.75 \times 10^6$  viable cells/ml in serum-supplemented TC-100 medium. Glucose was almost exhausted from culture medium, but lactate was not produced. Amino acids, with the exception of glutamine and asparagine, were only negligibly consumed or produced. UFL-AG-286 cells appeared to be unable to synthesize alanine as a metabolic way to dispose the by-product ammonia. Synchronic infection of UFL-AG-286 cell cultures with AgMNPV in the early -medium exponential growth phase, that yielded high amounts per cell of both viral progenies, reduced the specific nutritional demands of UFLAg-286 cells.

## Keywords

*Anticarsia gemmatalis* multicapsid nucleopolyhedrovirus – Baculovirus – Cell suspension culture - Lepidopteran insect cell line – UFL-AG-286

## Introducción

*Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: *Noctuidae*) es una de las principales plagas defoliadoras de los cultivos de soja en Latinoamérica (1). Este insecto es efectivamente controlado con un baculovirus, el virus de la poliedrosis nuclear múltiple de *Anticarsia gemmatalis* (AgMNPV) (2, 3). Actualmente, la producción comercial de AgMNPV está basada en la propagación viral *in vivo* sobre larvas del insecto. Esta tecnología ha demostrado ser robusta y económicamente competitiva como para satisfacer los requerimientos de este bioinsecticida hasta el presente. Sin embargo, previsiones de una creciente demanda, y la posibilidad de introducir baculovirus genéticamente modificados que no se propaguen eficientemente en larvas, han estimulado el interés por desarrollar procesos alternativos de producción basados en la propagación viral *in vitro* en cultivos de células de insecto (4). Una característica relevante de estos procesos es que su rendimiento económico mejora a medida que aumenta en escala, haciéndolos atractivos para la producción industrial de baculovirus. Además, un mejor control de proceso y una calidad superior del producto son atractivos adicionales de los procesos de producción de baculovirus en cultivos celulares.

La selección de una línea celular susceptible a la infección viral y capaz de producir elevados rendimientos volumétricos de poliedros, el fenotipo viral con propiedades insecticidas, es el primer requisito para desarrollar un proceso factible para la producción de un baculovirus insecticida en cultivos de células de insecto. La replicación de AgMNPV ha sido evaluada en diferentes líneas celulares (4, 5, 6, 7, 8). Del análisis de esta información parece evidente que la línea celular homóloga UFL-AG-286 (9) exhibe una mayor susceptibilidad a la infección y mayores niveles de

producción viral que el resto de las líneas celulares evaluadas. Por lo tanto, la línea celular UFL-AG-286 podría constituir un sustrato promisorio para desarrollar un proceso industrial de producción de AgMNPV *in vitro*.

El desarrollo de un proceso de producción de un baculovirus *in vitro* a gran escala también requiere que las células de insecto soporten el cultivo en suspensión agitada (10). Las líneas de células de insecto mejor caracterizadas difieren en su habilidad para proliferar en cultivos en suspensión agitada. Las líneas IPLB-Sf-21 y Sf-9, derivadas del insecto *Spodoptera frugiperda*, se adaptan espontáneamente al cultivo en suspensión (11, 12). Por otro lado, las líneas celulares Tn-5 y High-5, derivadas del insecto *Trichoplusia ni*, requieren de agregado de heparina (13), o selección de subpoblaciones celulares (14, 15) para poder ser cultivadas en suspensión de células aisladas. La línea celular UFL-AG-286 fue originalmente establecida en forma de cultivos estáticos de células adherentes, obtenidas a partir de embriones de *Anticarsia gemmatilis* (9), y no existe información publicada acerca de su adaptabilidad al crecimiento en cultivos en suspensión agitada. En consecuencia, los parámetros cinéticos de los cultivos en suspensión de UFL-AG-286 tampoco han sido determinados.

El conocimiento de los requerimientos nutricionales y las características metabólicas es necesario cuando se planea utilizar una línea de células animales en el desarrollo de un proceso productivo. La cuantificación de las demandas de los nutrientes más importantes permite anticipar, y eventualmente también evitar, limitaciones nutricionales que podrían afectar el rendimiento del proceso. Además, las características metabólicas de una línea celular pueden determinar la selección de una estrategia de cultivo particular. Por ejemplo, la falta de producción de metabolitos tóxicos en cultivos bien oxigenados de las líneas celulares IPLB-Sf-21 y Sf-9 hace posible el uso de estrategias de suplementación nutricional para mantener los cultivos en producción a muy altas densidades celulares (16, 17, 18). Por el contrario, la línea celular High-5 presenta un comportamiento metabólico diferente, caracterizado por la acumulación de lactato y amonio (14), que podría limitar la aplicabilidad de una estrategia de alimentación con nutrientes para obtener cultivos de alta densidad celular (19). Estas diferencias, además, ilustran acerca de la diversidad de perfiles metabólicos que es posible encontrar en distintas líneas de células de insecto, y enfatizan la importancia de caracterizarlos en cualquier línea celular con potencial utilización en procesos productivos. Los requerimientos nutricionales de la línea celular UFL-AG-286 no han sido investigados, y sus particulares propiedades metabólicas permanecen aún desconocidas.

En este trabajo se demuestra que la línea celular UFL-AG-26 puede ser fácilmente adaptada al crecimiento en cultivos en suspensión agitada, cuyos parámetros cinéticos fueron determinados luego de su adaptación. Por otro lado, se caracterizaron los perfiles nutricionales y metabólicos de cultivos no infectados e infectados con AgMNPV. La producción viral de los cultivos adaptados a suspensión e infectados con AgMNPV fue también evaluada.

## **Materiales y métodos**

### **Línea celular y medio de cultivo**

Se utilizaron células de la línea UFL-AG-286, que fueron gentilmente cedidas por el Dr. Víctor Romanowski, (IBBM, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de La Plata). Las células fueron mantenidas en forma de cultivos adherentes en frascos plásticos de 25 cm<sup>2</sup> de superficie, en medio de cultivo TC-100 (Invitrogen, USA), suplementado con 10% de suero fetal bovino (Bioser, República Argentina), a 27°C de temperatura. Los cultivos se repicaron en medio fresco, a una dilución 1:10, cada cuatro a cinco días.

### **Cultivos en suspensión y procesamiento de muestras**

Los cultivos en suspensión se realizaron en frascos de vidrio de 500 ml de volumen nominal (50 ml de volumen de trabajo), provistos con un agitador magnético pendular con una velocidad de giro de 80 rpm, y colocados sobre una plataforma de agitación (Techne, Gran Bretaña). Las muestras obtenidas de los cultivos en suspensión fueron procesadas de la siguiente manera: una alícuota de cada muestra de suspensión celular se tiñó con Trypan blue 0,4% para realizar el recuento de células totales y viables en una cámara de Neubaer; otra alícuota se centrifugó a baja velocidad, el sobrenadante se separó del sedimento celular y se conservó a -20°C para determinar posteriormente las concentraciones de nutrientes y metabolitos. Para diferenciar células aisladas de aquellas asociadas en agregados, los recuentos celulares se realizaron antes y después de disociar los agregados celulares con pipeta.

### **Análisis de nutrientes y metabolitos**

Las concentraciones de glucosa y lactato en los sobrenadantes de cultivo se determinaron, mediante reacciones enzimáticas automatizadas en un analizador YSI 2700 (Yellow Spring Instruments, Estados Unidos). Las concentraciones de dieciocho aminoácidos diferentes se determinaron por cromatografía líquida de alto rendimiento (HPLC) (Beckmann, Estados Unidos), utilizando una columna de fase reversa, con una derivatización previa con oftalaldialdehído. La concentración de amonio en los sobrenadantes de cultivo se determinó utilizando un equipo comercial (Wiener Lab, República Argentina).

### **Determinación de los parámetros cinéticos de los cultivos en suspensión**

La velocidad específica de crecimiento de los cultivos fue calculada a partir de la región lineal de una representación gráfica semilogarítmica de la densidad celular en función del tiempo de cultivo. Para cultivos en la fase exponencial de crecimiento, las velocidades celulares específicas de consumo o producción se determinaron calculando primero el rendimiento celular, obtenido a partir de la representación gráfica de la concentración del componente de interés en función de la densidad de células viables, y luego multiplicando ese valor por la velocidad celular específica de crecimiento del cultivo. En cultivos infectados, las velocidades celulares específicas de consumo/producción de los diferentes nutrientes se determinaron calculando primero la velocidad de cambio de la concentración

del componente de interés, en el período de tiempo correspondiente, y luego dividiendo por la densidad promedio de células viables.

### **Virus y cuantificación viral**

La cepa de virus AgMNPV utilizada fue originalmente aislada en la localidad de Oliveros (Provincia de Santa Fe, República Argentina) (20). El stock de virus utilizado en estos experimentos fue preparado por infección de cultivos estáticos de células UFL-AG-286 ( $2 \times 10^5$  cells.ml<sup>-1</sup>), con el segundo pasaje en cultivos celulares del aislamiento original, a una multiplicidad de infección de 0,1 dosis infecciosas para cultivos celulares 50% (DICC<sub>50%</sub>) por célula. Las muestras obtenidas de los cultivos infectados se procesaron como se describió para los cultivos no infectados, pero se tomaron, además, muestras adicionales de sobrenadante de cultivo para la cuantificación de virus brotados, y del sedimento celular para la cuantificación de poliedros, las cuales fueron conservadas a -80°C hasta su procesamiento.

Los virus brotados se cuantificaron mediante un ensayo de dilución límite y punto final. Brevemente, para determinar la DICC<sub>50%</sub>, una suspensión de células UFL-AG-286 conteniendo  $3 \times 10^5$  cells.ml<sup>-1</sup> fue sembrada en pocillos de una placa de cultivos celulares de 96 orificios (50 µ/ml por pocillo), para luego agregar en cada pocillo un volumen igual de diluciones seriadas logarítmico-decimales de la muestra a cuantificar (cinco réplicas por cada dilución). Luego de incubar a 27°C durante una semana, las placas fueron observadas para registrar los pocillos infectados, calculándose el título viral por el método desarrollado por Reed y Muench (21). Por otro lado, el título de poliedros asociados a células de cada muestra se determinó luego de extraer cada culote celular con SDS 1%, contándose los poliedros liberados en una cámara de Neubauer.

## **Resultados**

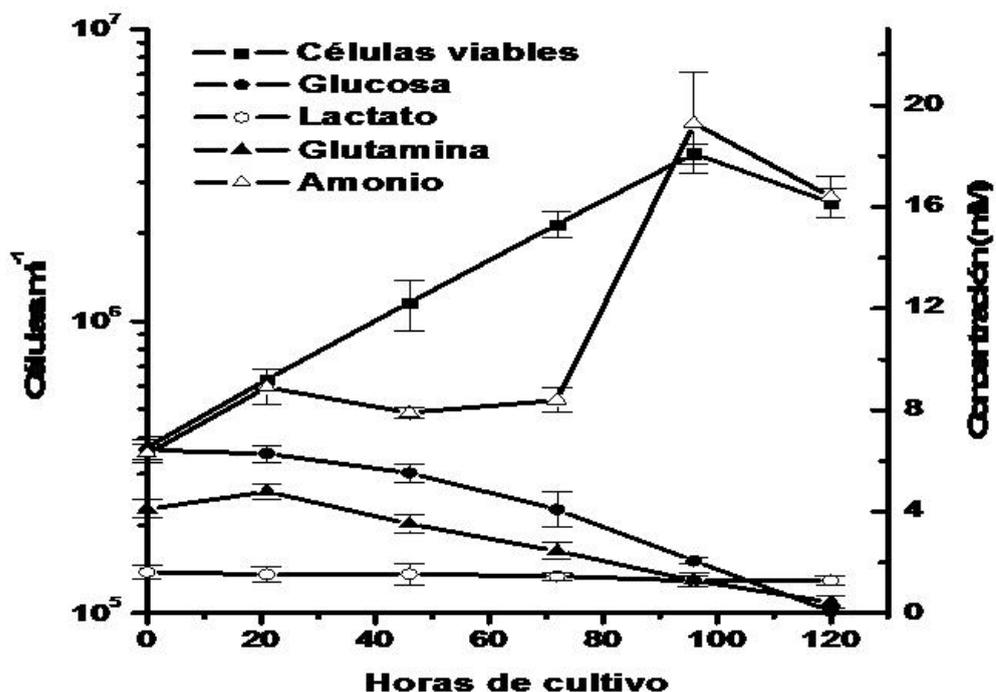
### **Adaptación de la línea celular UFL-AG-286 al cultivo en suspensión**

Cultivos de la línea celular UFL-AG-286 en el medio TC-100 suplementado con 10 % SFB fueron adaptados al crecimiento en suspensión. Para ello, cultivos estáticos se desprendieron de la superficie de la botella plástica mecánicamente. La suspensión celular resultante se centrifugó, se resuspendió en medio fresco a una densidad celular de  $3,5 \times 10^5$  células viables.ml<sup>-1</sup>, se colocó en un frasco de cultivo, y se comenzó a agitar sobre una plancha magnética con agitador pendular hasta que el cultivo alcanzó una densidad de  $1,5 \times 10^6$  células viables.ml<sup>-1</sup>, momento en el cual se realizó el primer subcultivo. Los primeros pasajes en suspensión se caracterizaron por una elevada proporción de células agrupadas en agregados de diversos tamaños. Con el objetivo de seleccionar una población de células capaces de proliferar en forma aislada en cultivos en suspensión, antes de cada repique el cultivo se trasvasó a un tubo plástico cónico de 50 ml y se dejó sedimentar durante 1 minuto. Al cabo de ese tiempo se cosechó la parte superior del cultivo, enriquecida en células aisladas, y se resuspendió en medio fresco para obtener una densidad de  $3,5 \times 10^5$  células viables / ml. La proporción de células aisladas se incrementó progresivamente con los subcultivos sucesivos, hasta que luego de 30 pasajes el 80% de las células no formó agregados. En cultivos en suspensión

mantenidos sin sedimentación previa a cada pasaje, el porcentaje de células aisladas no varió significativamente a lo largo de los sucesivos subcultivos. La línea celular resultante del proceso de adaptación al cultivo en suspensión se denominó saUFL-AG-286.

### Determinación de los parámetros cinéticos de los cultivos en suspensión

Para caracterizar los parámetros cinéticos de los cultivos de células UFL-AG-286 adaptadas al crecimiento en suspensión (saUFL-AG-286), un cultivo en el pasaje trigésimo en suspensión se diluyó en medio fresco a una densidad de  $3,7 \times 10^5$  células viables. $\text{ml}^{-1}$ . El cultivo fue incubado en estufa a 28°C, y cada 24 horas se tomó una alícuota de la suspensión celular para cuantificación de células totales y viables. No se observó fase "lag" al comienzo del cultivo, cuyo crecimiento se extendió hasta las 96 horas (figura 1). La velocidad de multiplicación celular específica mantuvo un valor constante de  $0,024 \text{ h}^{-1}$  (tiempo de duplicación: 28,9 h). La densidad celular máxima, alcanzada a las 96 horas de cultivo, fue de  $3,7 \times 10^6$  células viables.  $\text{ml}^{-1}$ . La viabilidad del cultivo se mantuvo en porcentajes superiores al 98% hasta las 96 horas, y luego decayó abruptamente sin mediar fase estacionaria.



**Figura 1.** Curva de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de metabolitos en cultivos en suspensión de la línea celular saUFL-AG-286, en el medio de cultivo TC-100 + 10% SFB. Se representan en la figura los promedios y las desviaciones estándar de los valores obtenidos de tres réplicas independientes.

### Consumo de nutrientes y producción de metabolitos

Para caracterizar el perfil nutricional y metabólico de los cultivos de células saUFL-AG-286, se determinaron las concentraciones de glucosa, lactato, amonio y dieciocho aminoácidos en los sobrenadantes de las muestras obtenidas a los distintos tiempos de cultivo. Como se puede observar en la figura 1, la concentración de glucosa decayó constantemente desde el comienzo, hasta agotarse entre las 96 y 120 horas de cultivo. La velocidad de consumo celular específica de glucosa se mantuvo constante hasta las 96 horas, en un valor de  $3,2 \times 10^{-11}$  mmol.cell<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>. La glutamina, luego de un incremento inicial de su concentración durante las primeras 24 horas de cultivo, que se verificó también para el resto de los aminoácidos (no se muestra), fue consumida rápidamente hasta agotarse a las 120 horas. La velocidad de consumo celular específica de glutamina alcanzó un valor máximo de  $5,87 \times 10^{-11}$  mmol.cell<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> y luego decayó exponencialmente. La concentración de lactato, un producto del metabolismo de la glucosa y la glutamina en muchas líneas de células animales, se mantuvo constante durante toda la evolución del cultivo. Por otro lado, la concentración de amonio, un producto del metabolismo de los aminoácidos, se mantuvo casi constante hasta las 72 horas de cultivo, para luego crecer abruptamente y alcanzar un valor máximo apenas inferior a 20 mM a las 96 horas.

La mayoría de los aminoácidos no fueron significativamente consumidos en los cultivos de células saUFL-AG-286 (cuadro 1). Sólo glutamina (89%), asparagina (31%), metionina (29%) y leucina (20%) fueron consumidos en porcentajes superiores al 20% de su concentración inicial. Serina y tirosina fueron consumidos en porcentajes cercanos al 15%, mientras que alanina, arginina, glicina, lisina, fenilalanina, treonina y triptofano lo fueron sólo en mínimas proporciones respecto a sus respectivas concentraciones iniciales. Por otro lado, glutamato, aspartato, valina, isoleucina e histidina incrementaron su concentración en el transcurso del cultivo. Cabe destacar que el consumo de glutamina representó el 50% del total del consumo de aminoácidos en los cultivos en suspensión de saUFL-AG-286.

**Cuadro 1.** Concentraciones iniciales y finales de aminoácidos en los sobrenadantes de cultivo de células saUFL-AG-286 no infectados e infectados con AgMNPV (mM).

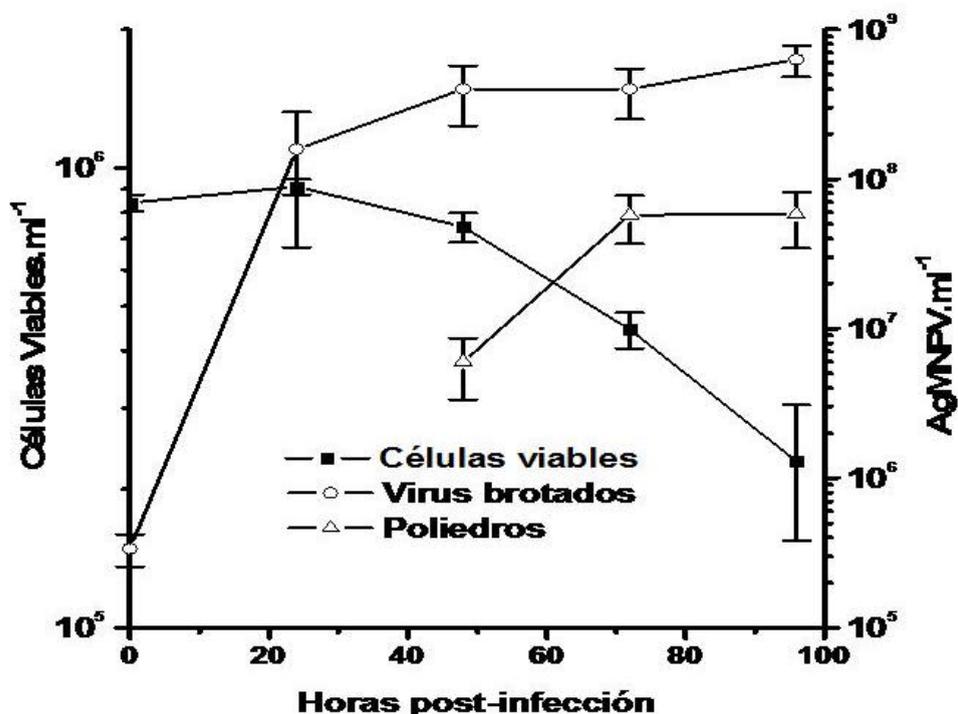
Compuesto	Cultivo no infectado		Cultivo infectado	
	0 h	120 h	0 hpi	96 hpi
Alanina	2,78	2,44	2,75	2,40
Arginina	3,52	3,32	3,24	3,38
Asparagina	3,47	2,38	3,26	3,04
Aspartato	3,25	3,51	3,23	3,54
Fenilalanina	1,34	1,29	1,28	1,31
Glicina	8,81	8,71	8,40	8,97
Glutamina	4,11	0,44	3,22	2,38
Glutamato	5,24	5,29	4,87	5,61
Histidina	16,56	17,59	15,92	17,64
Isoleucina	0,90	0,95	0,96	1,03
Leucina	1,27	1,02	1,19	1,19
Lisina	4,12	3,58	3,84	3,72
Metionina	0,76	0,55	0,76	0,63
Serina	5,22	4,40	4,88	4,91
Tirosina	0,49	0,42	0,47	0,49
Treonina	1,64	1,63	1,62	1,75
Triptofano	0,61	0,60	0,67	0,57
Valina	1,38	1,45	1,48	1,53

\* Cultivos de saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV a una multiplicidad de infección de 3 DICC<sub>50%</sub>.célula<sup>-1</sup>, cuando los cultivos alcanzaron una densidad celular de 8,4x10<sup>5</sup>células.ml<sup>-1</sup>.

#### Infección de células saUFL-AG-286 con AgMNPV

Cultivos en suspensión de células saUFL-AG-286 en medio TC-100 + 10% SFB, sembrados inicialmente a una densidad de 3,5 x 10<sup>5</sup> células viables.ml<sup>-1</sup>, fueron infectados 36 horas después con AgMNPV (multiplicidad de infección: 3 DICC<sub>50%</sub>.ml<sup>-1</sup>) cuando habían alcanzado una densidad de 8,4 x 10<sup>5</sup> células viables.ml<sup>-1</sup>. Se tomaron muestras de los cultivos infectados, cada 24 horas, para realizar recuento de células totales, viables e infectadas (distinguibles por la acumulación de poliedros virales), y se separaron muestras para realizar titulación de virus brotados y recuento de poliedros. La evolución de los cultivos infectados se puede observar en la figura 2. Las primeras 24 horas post-infección se caracterizaron por un ligero incremento de la densidad de células totales, mientras la viabilidad se mantenía por arriba del 90%. Luego, el número de células viables comenzó a disminuir, lentamente hasta las 48 horas, y luego en forma exponencial hasta alcanzar un valor de viabilidad inferior al 30 % a las 96 horas post-infección. La lisis celular no fue importante, de acuerdo a la evolución de los recuentos de células totales, que no decrecieron significativamente hasta las 96 horas (no se muestra). Las primeras células con poliedros virales visibles en su interior se observaron a las 48 horas post-infección (50% del total de las células), si bien desde las 24 horas se pudieron

apreciar claros signos de efecto citopático temprano típico de la infección por baculovirus, caracterizado por el aumento de tamaño y redondeamiento celulares. El número de células conteniendo cúmulos de poliedros no se incrementó luego de las 48 horas post-infección.



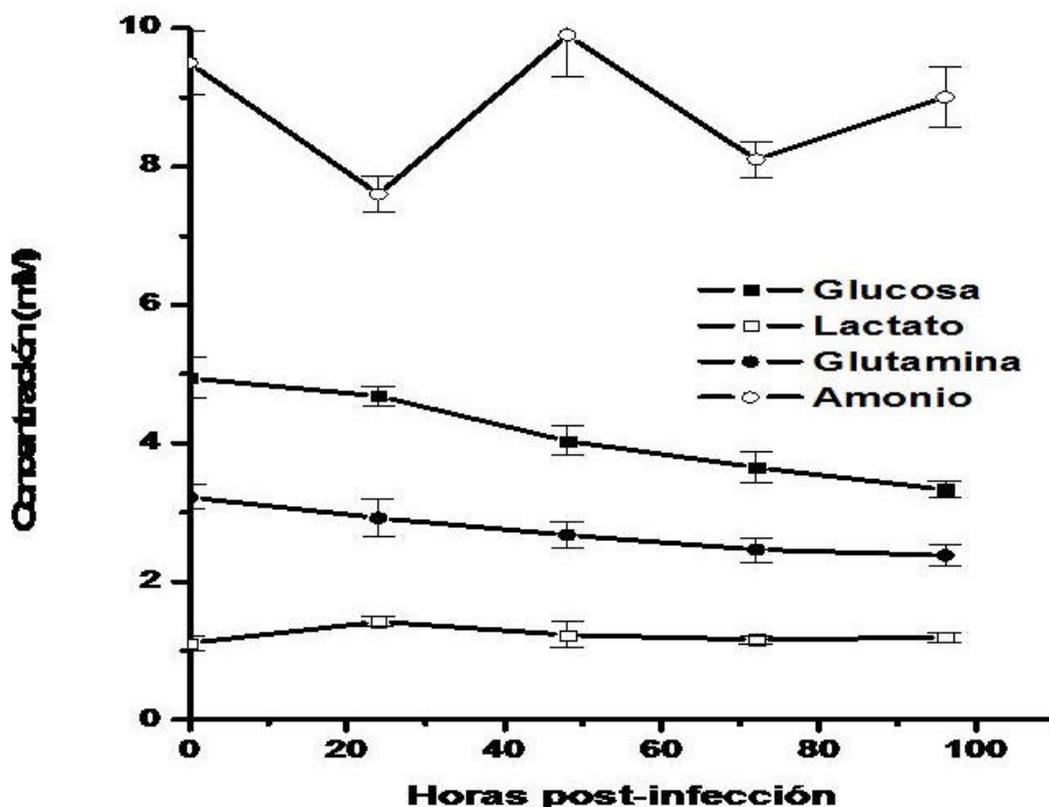
**Figura 2.** Evolución de cultivos en suspensión de células saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV a una multiplicidad de infección de 3 DICC<sub>50%</sub>.célula<sup>-1</sup>, cuando los cultivos alcanzaron una densidad celular de 8,4x10<sup>5</sup> células.ml<sup>-1</sup>. Se representan en la figura los promedios y las desviaciones estándar de los valores obtenidos de tres réplicas independientes.

En la figura 2 se puede observar también la evolución en el tiempo de los títulos de virus brotados y poliedros en los cultivos de saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV. La producción de virus brotados aumentó rápidamente durante las primeras 24 horas post-infección, y luego mucho más lentamente, hasta alcanzar un título máximo de 63 x 10<sup>8</sup> DICC<sub>50%</sub>.ml<sup>-1</sup> a las 96 hpi (rendimiento celular específico: 692 DICC<sub>50%</sub>.cel.<sup>-1</sup>). Los primeros poliedros virales se detectaron a las 48 hpi, en forma coincidente con la observación de las primeras células conteniendo cuerpos de inclusión y con la reducción inicial de la viabilidad celular. La concentración de poliedros se incrementó hasta alcanzar un título máximo de 5,8 x 10<sup>7</sup> poliedros.ml<sup>-1</sup> a las 72 hpi (rendimiento celular específico: 64 poliedros.cel.<sup>-1</sup>).

### Consumo de nutrientes y producción de metabolitos en cultivos infectados

Glucosa y glutamina, al igual que en los cultivos no infectados de saUFL-AG-286, fueron los nutrientes consumidos a mayor velocidad en los cultivos infectados con AgMNPV (figura 3). La velocidad celular específica de consumo de glucosa se redujo con respecto a los cultivos no infectados durante las primeras 24 hpi, período durante el cual alcanzó un valor de 1,24 x 10<sup>-11</sup> mmol.cel.<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>, aproximadamente un tercio de la velocidad correspondiente a la fase de crecimiento

exponencial de un cultivo no infectado. Sin embargo, en el período comprendido entre las 24 y 72 hpi la velocidad de consumo de glucosa retomó el valor previo a la infección. La concentración de lactato no se modificó significativamente a la largo del período de infección. El consumo de glutamina también se redujo inmediatamente luego de la infección, a un valor de  $1,42 \times 10^{-11}$  mmol.cel.<sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup>; esta velocidad se mantuvo constante durante todo el período post-infección. Sólo cinco aminoácidos más se consumieron en cultivos infectados: alanina, asparagina, lisina, metionina y triptofano (cuadro 1). Los otros aminoácidos incrementaron su concentración en los sobrenadantes de cultivos infectados, mientras que la concentración de amonio osciló sin cambios significativos (figura 3).



**Figura 3.** Consumo de nutrientes y producción de metabolitos en cultivos en suspensión de células saUFL-AG-286 infectados con AgMNPV a una multiplicidad de infección de 3 DIC<sub>50%</sub>.célula<sup>-1</sup>, cuando los cultivos alcanzaron una densidad celular de  $8,4 \times 10^5$  células.ml<sup>-1</sup>. Se representan en la figura los promedios y las desviaciones estándar de los valores obtenidos de tres réplicas independientes.

### Discusión

La adaptación de la línea celular UFL-AG-286 al cultivo en suspensión agitada fue el primer objetivo de este trabajo. La mayor parte de las células transferidas desde cultivos estáticos a suspensión agitada tendieron a agregar en forma heterogénea, con una minoría de células proliferando en forma aislada. Similar comportamiento ha sido descrito para la línea celular Tn-5 (22). Diversos procedimientos fueron utilizados con el propósito de obtener células de esta línea (o de su derivado comercial High-5) con capacidad de multiplicarse en forma aislada (13, 14, 15). El procedimiento empleado en este trabajo con células UFL-AG-286, aplicando sedimentación

diferencial para separar los agregados celulares de mayor tamaño antes de cada subcultivo, permitió seleccionar, en un tiempo relativamente reducido, una subpoblación de células que no tienden a agregarse entre sí cuando son agitadas en cultivos en suspensión. Por el contrario, cuando los agregados no fueron separados antes de cada subcultivo, la línea celular no modificó significativamente su comportamiento. Esta diferencia podría ser una evidencia de la complejidad poblacional de la línea celular UFL-AG-286. La mayoría de las líneas de células de insecto fueron establecidas a partir de cultivos primarios de embriones o de órganos de adultos, y por lo tanto no estaban originalmente constituidas por una población celular homogénea. La línea UFL-AG-286, fue establecida a partir de un cultivo primario de embriones de *Anticarsia gemmatalis* (9). Si bien el procedimiento que se utiliza para establecer una línea celular selecciona una subpoblación celular particular entre los diferentes tipos de células presentes en un cultivo primario heterogéneo, la coexistencia de subpoblaciones celulares diferentes en una línea establecida es aún posible, como se demostró para la línea celular IPLB-Sf-21 (23). El procedimiento de enriquecimiento de células capaces de proliferar en forma aislada en suspensión agitada (saUFL-AG-286) podría, entonces, haber seleccionado una población de composición diferente a la original (UFL-AG-286). En consecuencia, el comportamiento de la subpoblación seleccionada podría no reflejar necesariamente las propiedades de la línea celular no sometida a proceso de selección.

El valor de la velocidad específica de crecimiento de los cultivos en suspensión agitada de saUFL-AG-286 está dentro del rango de velocidades determinadas en cultivos en suspensión de otras líneas de células de insectos lepidópteros (24, 25, 26). Pero, por otro lado, este valor es significativamente mayor que el informado por Sieburth y Maruniak cuando establecieron originalmente la línea celular UFL-AG-286 en 1986 (9). Desde entonces, esta línea ha sido sometida a un número indeterminado de pasajes sucesivos, a través de los cuales se podría haber producido un paulatino mejoramiento de la velocidad específica de multiplicación celular. Este fenómeno ha sido previamente descrito en cultivos de células de *Trichoplusia ni* (27). Si bien no puede descartarse que la selección de la subpoblación de células capaces de proliferar aisladas en suspensión haya determinado también un mejoramiento de la velocidad específica de crecimiento, este aporte debe ser marginal, ya que la velocidad de crecimiento de los cultivos en monocapa no adaptados a suspensión es también mayor que la descrita por los autores que establecieron la línea celular (Paultroni *et al.*, resultados no publicados).

Una característica destacable de los cultivos de saUFL-AG-286 es la estabilidad de la velocidad específica de proliferación durante la fase de crecimiento. Por el contrario, en cultivos de otras líneas de células de insectos lepidópteros, la velocidad específica se incrementa hasta un máximo durante la fase temprana de crecimiento del cultivo, y luego decrece (28, 29). El nivel de variabilidad de la velocidad específica de proliferación puede considerarse como una expresión de la sensibilidad de los mecanismos de regulación de la proliferación celular a los cambios que ocurren, en la biomasa y en el ambiente, como consecuencia de las actividades celulares en el cultivo. Esa variabilidad, que es notable en cultivos de la línea celular Sf-9, ha sido explicada por el agotamiento de nutrientes o la acumulación de metabolitos (30, 31), o, alternativamente, por la dependencia de la actividad de factores de crecimiento autocrinos (32). De cualquier manera, la regulación de los

mecanismos de proliferación de la línea saUFL-AG-286 parece ser relativamente insensible a las modificaciones celulares y ambientales que determinan la variación de la velocidad específica de proliferación en otras líneas de células de insecto.

El fin de la fase de crecimiento fue coetánea con el agotamiento de glucosa y glutamina en el medio de cultivo, y también con una rápida caída de la viabilidad celular. El aumento de la mortalidad luego del agotamiento de los hidratos de carbono contenidos en el medio de cultivo de células de insecto ha sido observado en cultivos de otras líneas de células de insecto (28, 33, 34, 35, 36). Por el contrario, el agotamiento de glutamina es compatible con la supervivencia y capacidad de proliferación de algunas líneas celulares (37). La acumulación de catabolitos podría también ser una causa de la reducción de la viabilidad de los cultivos. El amonio es un catabolito tóxico para las células animales, pero los niveles de concentración alcanzados no deberían limitar la viabilidad de los cultivos de saUFL-AG-286, de acuerdo a los datos obtenidos con otras líneas de células de insecto (37, 38). Por otro lado, el lactato, otro potencial metabolito tóxico en cultivos de células animales, no incrementó su concentración en el medio de cultivo. Por lo tanto, el rápido ascenso de la mortalidad celular en los cultivos de saUFL-AG-286 podría ser producto de una limitación nutricional, más probablemente asociada al agotamiento de glucosa, que una consecuencia de la acumulación de productos metabólicos tóxicos. Por otro lado, no se puede obviar la posibilidad de la contribución del agotamiento de otros nutrientes, no determinados en este trabajo, como lípidos y vitaminas, al rápido incremento de la mortalidad celular.

Los hidratos de carbono constituyen la principal fuente de carbono y energía en cultivos de células animales. La glucosa, el único hidrato de carbono presente en el medio TC-100, fue el nutriente consumido en mayor extensión en cultivos en suspensión de células saUFL-AG-286. La velocidad celular específica de consumo de glucosa fue ligeramente menor que las velocidades máximas determinadas en otras líneas de células de insecto bajo diferentes condiciones de cultivo (15, 35, 28, 38). Esta baja velocidad de consumo podría ser consecuencia de la relativamente baja concentración de glucosa en el medio de cultivo TC-100. Bédard *et al.* (38) observaron que los cultivos de las líneas celulares Sf-9 y BTI-EAA consumían glucosa a una menor velocidad en medio TNM-FH que en otros medios de cultivo que contenían una mayor concentración inicial de glucosa. Se debe señalar que la glucosa fue consumida, en cultivos de células saUFL-AG-286, a una velocidad constante a lo largo de todo el cultivo, mientras que en cultivos de otras líneas de células de insecto la velocidad de consumo de glucosa incrementa hasta alcanzar un valor máximo en la mitad de la fase de crecimiento, para luego decaer (28).

La velocidad de consumo de glutamina, a diferencia de la de glucosa, no resultó constante. El valor máximo de esta velocidad fue mayor que el observado en cultivos de otras líneas de células de insectos (15, 35, 38). Si se analiza el cociente de los rendimientos de células en glutamina y glucosa, en cultivos de células saUFL-AG-286 se alcanza un valor de 0,84, mientras que en cultivos de otras líneas de células de insectos ese valor varía entre 0,15 y 0,53. Esta inusualmente elevada preferencia por glutamina podría también estar relacionada con la baja concentración de glucosa en el medio TC-100, si se considera que la glutamina puede constituir una fuente de energía alternativa a los hidratos de carbono. Se deberán realizar experimentos adicionales para determinar si este comportamiento es

sólo una respuesta adaptativa al nivel de glucosa en el medio de cultivo, o si estas células poseen efectivamente una mayor avidez constitutiva por la glutamina como fuente de energía.

Tres aminoácidos más (asparagina, metionina y leucina) fueron también consumidos en una proporción significativa en los cultivos en suspensión de saUFL-AG-286, pero estuvieron lejos de ser agotados, por lo que no constituirían potenciales limitaciones nutricionales. El resto de los aminoácidos fueron consumidos en mucha menor proporción, o su concentración se incrementó durante la evolución de los cultivos. De esta manera, el medio de cultivo TC-100 aporta aminoácidos en exceso respecto a los reales requerimientos de las células saUFL-AG-286. El exceso de la concentración de aminoácidos en los medios utilizados para el cultivo de células de insecto ha sido demostrado también en cultivos de Sf-9 (38, 39). Se debe hacer notar que en estos experimentos no se siguió la evolución de la concentración de cistina/cisteína, un aminoácido que es consumido a un elevado nivel en cultivos de células Sf-9, y cuya concentración determina la velocidad de consumo de otros aminoácidos (29); por lo tanto no es posible especular acerca de su importancia como nutriente en cultivos de saUFL-AG-286.

La línea celular saUFL-AG-286 expresa un patrón de producción de metabolitos cuyas principales características son la falta de producción de lactato, la producción de amonio y la falta de producción de alanina. Este patrón es diferente de los descriptos para otras líneas de células de insecto caracterizadas previamente: los cultivos de las líneas IPLB-Sf-21 y Sf-9, en condiciones de oxigenación y suministro de glucosa adecuados, se caracterizan por la falta de producción de lactato y amonio, con producción de alanina, mientras que, en las mismas condiciones, en cultivos de células Tn-5 o High-5, con un patrón similar al descrito en cultivos de células de mamíferos, se produce acumulación de lactato, amonio y alanina en el sobrenadante (15). La determinación de diferencias en los patrones de producción de los metabolitos de las principales fuentes nutricionales pone en evidencia la existencia de diferencias a nivel del procesamiento metabólico de los nutrientes en distintas líneas celulares (40, 41). Por tanto, la expresión de un patrón diferente de producción de metabolitos podría estar indicando la existencia de un ordenamiento particular de los flujos metabólicos en la línea celular saUFL-AG-286, en relación a otras líneas de células de insectos. Esta hipótesis deberá corroborarse experimentalmente mediante medición de actividades enzimáticas y seguimiento de moléculas trazadoras, pero mientras tanto, utilizando la información obtenida de estudios realizados con otras líneas de células de insecto, es posible adelantar algunas de las características que tendría el metabolismo de los principales nutrientes en las células saUFL-AG-286. En este sentido, la falta de producción de lactato podría indicar una eficiencia superior para oxidar la glucosa en forma completa en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, tal como sucede con las líneas IPLB-Sf-21 y Sf-9 (40, 41).

Por otro lado, la evolución de los niveles de alanina representa una situación particular. La alanina es un producto principal del metabolismo de la glucosa y la glutamina, tanto en células de insecto como en células de mamífero. Sorprendentemente, los cultivos de saUFL-AG-286 no acumulan alanina, mientras el amonio es activamente producido. De los datos del cuadro 1 se puede deducir que el monto total de amonio producido en un cultivo de saUFL-AG-286

(10,10 mM) iguala, aproximadamente, al rendimiento teórico de amonio proveniente de la completa metabolización de la glutamina (7,34 mM), más el correspondiente a la transformación de asparagina en aspartato (0,26 mM), más el derivado de la metabolización completa de la asparagina (1,66 mM). Estos datos indicarían que el amonio proveniente de la metabolización de la glutamina y la asparagina, los dos aminoácidos más consumidos en los cultivos de saUFL-AG-286, podría ser eliminado como tal, y que estas células carecerían de la capacidad de sintetizar alanina como una forma no tóxica de disponer del amonio. Este comportamiento guarda analogía parcial con el descrito en células Sf-9 en condiciones de limitación de glucosa, en las cuales la glutamina es primero transformada en glutamato por acción de una glutaminasa, para luego dar, en una reacción catalizada por una glutamato deshidrogenasa, 2-oxoglutarato, que luego puede ser completamente oxidado a dióxido de carbono en el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (42). En relación al metabolismo de la asparagina, no se puede encontrar analogía con el comportamiento de las células Sf-9, ya que éstas no lo consumen o lo hacen en una baja proporción, pero sí con las células High-5, que sí lo hacen, y para las cuales se ha propuesto que la metabolizan a través de una vía que involucra la actividad de una asparaginasa y una aspartato dehidrogenasa (15).

No se pudo detectar ninguna limitación nutricional en los cultivos infectados con AgMNPV, ya que todos los nutrientes cuantificados, en las condiciones de infección empleadas en estos experimentos (infección sincrónica en la fase de crecimiento inicial a intermedia), se encontraron en exceso. Además, la infección con AgMNPV provocó una reducción de las demandas nutricionales específicas de los nutrientes más importantes, en forma más notable durante las primeras 24 hpi. Los efectos de la infección con baculovirus sobre las demandas nutricionales de las células de insecto han sido analizados previamente, con resultados contrastantes. Por un lado, en algunos trabajos se describió un incremento de la velocidad de consumo de nutrientes luego de la infección (4, 14, 43, 44). En otros trabajos, en cambio, no se han observado cambios significativos en las velocidades de consumo de los principales nutrientes (45, 46, 47), mientras que Rhiel y Murhammer mostraron que la infección de células IPLB-Sf-21 resultó en una reducción de la velocidad celular específica de consumo de glucosa (48). En el análisis de estas observaciones se debe tomar en consideración que la demanda nutricional de una célula infectada no debe estar determinada sólo por las necesidades específicas vinculadas a la atención del proceso de replicación viral, y por los efectos que la infección ejerce sobre el metabolismo celular, sino que también debe influir el estado nutricional y metabólico de la célula al momento de la infección. La marcada reducción de la velocidad de consumo de glucosa y glutamina observada inmediatamente luego de la infección con AgMNPV de los cultivos de células saUFL-AG-286 podría ser explicada por la interrupción inmediata de la proliferación celular luego de la infección, en cultivos que se encontraban en estado de activa división. En el balance de la demanda nutricional, el cese de la síntesis de biomasa en un contexto de abundancia intracelular de fuentes de carbono y energía, podría significar la disponibilidad inmediata de precursores para atender la replicación viral, menos demandante de nutrientes que los procesos afectados a la multiplicación de la biomasa, dando como resultado una disminución de la necesidad de incorporar nutrientes extracelulares. Sin embargo, podría ser posible que, cuando la infección se lleva a cabo en otras condiciones de menor disponibilidad intracelular de nutrientes, tal como sucede al final de la fase de

crecimiento o en la fase estacionaria del cultivo, la demanda nutricional podría incrementarse luego de la infección.

La replicación de AgMNPV en los cultivos en suspensión de saUFL-AG-286 siguió una cinética similar a la descrita para la replicación *in vitro* de otros baculovirus, con un pico de producción de virus brotados durante las primeras 24 hpi, seguido por un rápido ascenso de la producción de poliedros en el período comprendido entre las 24 y 72 hpi. Las características de la evolución de la infección con AgMNPV en los cultivos en suspensión de saUFL-AG-286 no difieren de lo descrito anteriormente en infecciones con el mismo virus en cultivos adherentes en monocapa (5, 7). Es evidente, entonces, que el número de pasajes que ha sido sometida la línea celular desde su establecimiento, y la selección de la subpoblación celular adaptada al cultivo en suspensión agitada, no han afectado la susceptibilidad a la infección o la permisividad a la replicación viral. Por otro lado, cuando se comparan los rendimientos de poliedros de AgMNPV alcanzados en estos experimentos con los obtenidos en cultivos de otras líneas celulares (4, 6, 8, 49, 50), se puede concluir que, entre las líneas celulares ensayadas hasta el presente, saUFL-AG-286 es la que permite alcanzar los mayores rendimientos de poliedros por célula. En los experimentos realizados en este trabajo se evaluó la producción viral en una única condición de infección, pero es posible que los rendimientos volumétricos obtenidos puedan aún ser mejorados significativamente luego de optimizar los parámetros de tiempo y multiplicidad de infección.

En conclusión, la línea celular UFL-AG-286 pudo ser adaptada al cultivo en suspensión a través de la selección de una subpoblación de células con capacidad para proliferar sin formar agrupaciones (saUFL-AG-286). Los cultivos adaptados crecieron con una cinética similar a otras líneas de células de insecto, pero exhibieron un perfil nutricional y metabólico característico. Los rendimientos de AgMNPV en los cultivos de saUFL-AG-286 resultaron suficientemente elevados como para sostener la factibilidad del uso de esta línea celular en el desarrollo de un proceso industrial de producción del bioinsecticida. El desarrollo de este proceso sólo será posible luego de optimizar la producción viral en un medio de cultivo libre de suero de bajo costo.

### **Agradecimientos**

Este trabajo fue realizado con el apoyo de ANPCyT (PICT 08-04411) y de la Universidad Nacional del Litoral (CAI+D 2002).

### **Referencias**

1. Moscardi F. Soybean integrated pest management in Brazil. *Plant Protect. Bull.* 1993; 41: 91-100.
2. Moscardi F, Allen GE, Greene GL. Control of the velvetbean caterpillar by nuclear polyhedrosis virus and insecticides and impact of treatments on the natural incidence of the entomopathogenic fungus *Nomuraea rileyi*. *J. Econ. Entomol.* 1981;74: 480-485.
3. Moscardi F. Assessment of the application of baculoviruses for control of Lepidoptera. *Annu. Rev. Entomol.* 1999; 44: 257-289.

4. Rodas VM, Marques FH, Honda MT, Soares DM, Jorge SAC, Antoniazzi MM, Medugno C, Castro MEB, Ribeiro BM, Souza ML, Tonso A, Pereira CA. Cell culture derived AgMNPV bioinsecticide: biological constraints and bioprocess issues. *Cytotechnology* 2005; 48: 27-39.
5. Sieburth PJ, Maruniak JE. Susceptibility of an established cell line of *Anticarsia gemmatalis* (Lepidoptera: Noctuidae) to three nuclear polyhedrosis viruses. *J. Invertebr. Pathol.* 1988; 52: 453-458.
6. Visnovsky G, Claus JD. Influence of time and multiplicity of infection on the batch production of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in lepidopteran insect cell cultures. *Advances in Bioprocess Engineering*, Kluwer Academic Publishers, Holanda, 1994, 123-128.
7. Castro MEB, Souza ML, Araujo S, Bilimoria SL. Replication of *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus in four lepidopteran cell lines. *J. Invertebr. Pathol.* 1997; 69: 40-45.
8. Grasela JJ, McIntosh AH. *In vitro* and *in vivo* host range of *Anticarsia gemmatalis* multiple nuclear polyhedrosis virus. *In Vitro Cell. Dev. Biol. – Animal* 1998; 34: 79-83.
9. Sieburth PJ, Maruniak JE. Growth characteristics of a continuous cell line from the velvetbean caterpillar, *Anticarsia gemmatalis* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 1988;24: 195-198.
10. Murhammer DW. Use of viral insecticides for pest control and production in cell culture. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1996; 59: 199-220.
11. Agathos SN. Insect cell bioreactors. *Cytotechnology* 1996; 20: 173-189.
12. Schmid G. Insect cell cultivation: growth and kinetics. *Cytotechnology* 1996; 20: 43-56.
13. Dee KU, Shuler ML, Wood HW. Inducing single-cell suspension cultures of BTI-TN5B1-4 insect cells: 1. The use of sulfated polyanions to prevent cell aggregation and enhance recombinant protein production. *Biotechnol. Bioeng.* 1997; 54: 191-205.
14. Sugiura T, Amann E. Properties of two insect cell lines useful for the baculovirus expression system in serum-free culture. *Biotechnol. Bioeng.* 1996; 51: 494-499.
15. Rhiel M, Mitchell-Logean CN, Murhammer DW. Comparison of *Trichoplusia ni* BTI- Tn5B1-4 (High Five) and *Spodoptera frugiperda* Sf-9 insect cell line metabolism in suspension cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 1997; 55: 909-920.
16. Nguyen B, Jarnagin S, Williams S, Chan H, Barnett J. Fed-batch culture of insect cells: a method to increase the yield of recombinant human nerve growth factor (rhNGF) in the baculovirus expression system. *J. Biotechnol.* 1993; 31: 205-217.
17. Bédard C, Perret S, Kamen AA. Fed- batch culture of Sf-9 cells supports  $3 \times 10^7$  cells per ml and improves baculovirus-expressed recombinant protein yields. *Biotechnol Lett.* 1997; 19: 629-632.
18. Elias CB, Zeiser A, Bédard C, Kamen AA. Enhanced growth of Sf-9 cells to a maximum density of  $5,2 \times 10^7$  cells per ml and production of  $\beta$ galactosidase at high cell density by fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* 2000; 68: 381-388.
19. Ikonomou L, Schneider Y-J, Agathos SN. Insect cell culture for industrial production of recombinant proteins. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2003; 62: 1-20.
20. Claus JD, Remondetto GE, Guerrero SA, Demonte AM, Murguía M, Marcipar AJ. *Anticarsia gemmatalis* nuclear polyhedrosis virus replication in serum-free and serum-reduced insect cell cultures. *J. Biotechnol.* 1993; 31: 1-15.

21. Reed L, Muench H. A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27: 493-497.
22. Wickham TJ, Nemerow GR. Optimization of growth methods and recombinant protein production in BTI-Tn5B1-4 insect cells using the baculovirus expression system. *Biotechnol Prog.* 1993; 9: 25-30.
23. Pasumarthy MK, Murhammer DW. Clonal variation in the *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf-21 AE insect cell population. *Biotechnol. Prog.* 1994; 10: 314-319.
24. Zhang J, Kalogerakis N, Behie LA, Iatrou K. Investigation of reduced serum and serum-free media for the cultivation of insect cells Bm-5 and the production of the baculovirus BmNPV. *Biotechnol. Bioeng.* 1992; 40: 1165-1172.
25. Chakraborty S, Monsour C, Teakle R, Reid S. Yield, biological activity and field performance of a wild-type *Helicoverpa* nucleopolyhedrovirus produced in *H. zea* cell cultures. *J. Invertebr. Pathol.* 1999; 73:199-205.
26. Taticek RA, Choi C, Phan S-E, Palomares LA, Shuler ML. Comparison of growth and recombinant protein expression in two different insect cell lines in attached and suspension culture. *Biotechnol Prog.* 2001; 17: 676-684.
27. Donaldson MS, Shuler ML. Effects of long-term passaging of BTI-Tn5B1-4 insect cells on growth and recombinant protein production. *Biotechnol. Prog.* 1998; 14: 543-548.
28. Drews M, Paalme T, Vilu R. The growth and nutrient utilization of the insect cell line *Spodoptera frugiperda* Sf9 in batch and continuous culture. *J. Biotechnol.* 1995; 40: 187-198.
29. Doverskog M, Han L, Häggström L. Cystine/cysteine metabolism in cultured Sf9 cells: influence of cell physiology on biosynthesis, amino acid uptake and growth. *Cytotechnology* 1998; 26: 91-102.
30. Bédard C, Kamen AA, Tom R, Massie B. Maximization of recombinant protein yield in the insect cell/baculovirus system by one-time addition of nutrients to high density batch cultures. *Cytotechnology* 1994; 15: 129-138.
31. Tom RL, Debanne MT, Bédard C, Caron AW, Massie B, Kamen AA. Improved yields of the extracellular domain of the epidermal growth factor receptor produced using the baculovirus expression system by medium replacement following infection. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1995; 44: 53-58.
32. Doverskog M, Ljunggren J, Öhman L, Häggström L. Physiology of cultured animal cells. *J. Biotechnol.* 1997; 59: 103-115.
33. Deutschmann SM, Jäger V. Optimization of the growth conditions of Sf21 cells for high density perfusion culture in stirred-tank reactors. *Enzyme Microb. Technol.* 1994; 16: 506-512.
34. Palomares LA, Ramírez OT. The effect of dissolved oxygen tension and the utility of oxygen uptake rate in insect cell culture. *Cytotechnology* 1996; 22: 225-237.
35. Mendonça RZ, Palomares LA, Ramírez OT. An insight into insect cell metabolism through selective nutrient manipulation. *J. Biotechnol.* 1999; 72: 61-75.
36. Meneses-Acosta A, Mendonça RZ, Merchant H, Covarrubias L, Ramírez OT. Comparative characterization of cell death between Sf9 insect cells and hybridoma cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 2001; 72: 441-457.

37. Öhman L, Alarcón M, Ljunggren J, Ramqvist AK, Häggström L. Glutamine is not an essential amino acid for Sf-9 insect cells. *Biotechnol Lett.* 1996; 18: 765-770.
38. Bédard C, Tom R, Kamen AA. Growth, nutrient consumption, and end-product accumulation in Sf-9 and BTI-EAA insect cell cultures: insights into growth limitation and metabolism. *Biotechnol Prog.* 1993; 9: 615-624.
39. Férrance JP, Goel A, Atai AM. Utilization of glucose and amino acids in insect cell cultures: quantifying the metabolic flows within the primary pathways and medium development. *Biotechnol. Bioeng.* 1993; 42: 615-624.
40. Neerman J, Wagner R. Comparative analysis of glucose and glutamine metabolism in transformed mammalian cell lines, insect and primary liver cells. *J. Cell. Physiol.* 1996; 166: 152-169.
41. Benslimane C, Elias CB, Hawari H, Kamen A. Insights into the central metabolism of *Spodoptera frugiperda* (Sf-9) and *Trichoplusia ni* BTI-Tn-5B1-4 (Tn-5) insect cells by radiolabeling studies. *Biotechnol. Prog.* 2005; 21: 78-86.
42. Drews M, Doverskog M, Öhman L, Chapman BE, Jacobsson U, Kuchel PW, Häggström L. Pathways of glutamine metabolism in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) insect cells: evidence for the presence of the nitrogen assimilation system, and a metabolic switch by  $^1\text{H}/^{15}\text{N}$  NMR\*. *J. Biotechnol.* 2000; 78: 23-37.
43. Kamen AA, Tom RL, Caron AW, Chavarie C, Massie B, Archambault J. Culture of insect cells in a helical ribbon impeller bioreactor. *Biotechnol. Bioeng.* 1991; 38: 619-628.
44. Radford, KM, Reid S, Greenfield PF. Substrate limitation in the baculovirus expression vector system. *Biotechnol. Bioeng.* 1997; 56: 32-44.
45. Wong TTK, Nielsen LK, Greenfield PF, Reid S. Relationship between oxygen uptake rate and time of infection of Sf-9 insect cells infected with a recombinant baculovirus. *Cytotechnology* 1994; 15: 157-167.
46. Kamen AA, Bédard C, Tom R, Perret S, Jardin B. On-line monitoring of respiration in recombinant-baculovirus-infected and uninfected insect cell bioreactor cultures. *Biotechnol. Bioeng.* 1996; 50: 36-48.
47. Palomares LA, López S, Ramírez OT. Utilization of oxygen uptake rate to assess the role of glucosa and glutamina in the metabolismo f infected insect cell cultures. *Biochem. Eng. J.* 2004; 19: 87-93.
48. Rhiel M, Murhammer DW. The effect of oscillating dissolved oxygen concentrations on the metabolism of a *Spodoptera frugiperda* IPLB-Sf-21 AE clonal isolate. *Biotechnol. Bioeng.* 1995; 47: 640-650.
49. Batista FRX, Pereira CA, Mendonça RZ, Moraes AM. Enhancement of Sf9 cells and baculovirus production employing Graces's medium supplemented with milk whey ultrafiltrate. *Cytotechnology* 2005; 49: 1-9.
50. Zhang YH, Enden G, Merchuk JC. Insect cells-Baculovirus system: Factors affecting growth and low MOI infection. *Biochem. Eng. J.* 2005; 27: 8-16.

\* Juan Daniel Claus  
Laboratorio de Virología  
Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas  
Universidad Nacional del Litoral  
Ciudad Universitaria  
CC 242  
S3000ZAA Santa Fe  
Tel-FAX: 0054-342-4575216 int. 118  
E-mail: [jclaus@fbcbl.unl.edu.ar](mailto:jclaus@fbcbl.unl.edu.ar)



Revista **QuímicaViva**  
Número 1, año 5, abril 2006  
[quimicaviva@qb.fcen.uba.ar](mailto:quimicaviva@qb.fcen.uba.ar)