

9  
2EJ.



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

EVALUACION DE LA FRACCION CN F.II.5 DEL ALACRAN MEXICANO CENTRUROIDES NOXIUS (HOFFMANN) EN LA GENERACION DE UNA RESPUESTA INMUNE PROTECTORA A MAMIFEROS.

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
B I O L O G O  
P R E S E N T A  
GERARDO ALFONSO ANGUIANO VEGA

DIRECTOR DE TESIS: DR. LOURIVAL DOMINGOS PASSANI POSTAY



MEXICO, D. F.

1999

271592

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

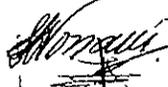
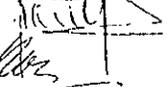
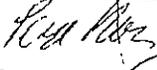
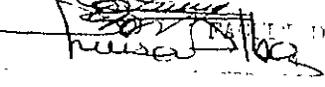


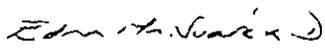
UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
Evaluación de la fracción Cn F.II.5 del Alacrán Mexicano *Centruroides noxius*  
(Hoffmann) en la generación de una respuesta inmune protectora a mamíferos.  
realizado por Anguiano Vega Gerardo Alfonso  
con número de cuenta 8927714-8 , pasante de la carrera de Biología  
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario Dr. Lourival Domingos Possani Postay   
Propietario Dra. Emma Soraida Calderón Aranda   
Propietario Q.F.B. Fernando Ramos Reyes   
Suplente Dr. Germán Rubén Aguilar Gutiérrez   
Suplente Dra. Luisa Alvarina Alba Lois 

Consejo Departamental de Biología  


INSTITUTO DE CIENCIAS  
A. I.

# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

---

FACULTAD DE CIENCIAS, UNAM, MEXICO.  
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA, UNAM, CUERNAVACA MOR.



EVALUACION DE LA FRACCION  $C_{H}$  F.II.5 DEL VENENO DEL ALACRAN MEXICANO *Centruroides noxius* (Hoffmann) EN LA GENERACION DE UNA RESPUESTA INMUNE PROTECTORA A MAMIFEROS.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A  
GERARDO ALFONSO ANGUIANO VEGA.

CUERNAVACA, MORELOS, 1999.

Esta tesis se desarrolló en el Instituto de Biotecnología de la UNAM, en Cuernavaca, Morelos, en el Departamento de Reconocimiento Molecular y Bioestructura, laboratorio del Dr. Lourival Domingos Possani Postay, bajo la asesoría del Dr. Possani y co-asesoría de la Dra. Emma Soraida Calderón Aranda del CINEVESTAV-IPN. Este trabajo fue financiado en parte por las aportaciones de los siguientes donativos:

Howard Hughes Medical Institute. Donativo No. 75197-52107.  
CONACyT. No. 4734-N9406  
DGAPA-UNAM. IN-211996 y IN-217997.

De la misma forma se agradece al Dr. Lourival Possani por las facilidades mostradas para la elaboración del trabajo experimental, los comentarios y asesorías hechas a esta tesis.

Quiero agradecer a la Dra. Emma Calderón por haber tomado parte como co-tutora y sinodal del presente trabajo, al Dr. Germán Aguilar, la Dra. Luisa Alba y Q.F.B. Fernando Ramos (Profesores de la Facultad de Ciencias), que muy amablemente se tomaron la molestia de leer este trabajo y fungieron como sinodales.

Un sincero agradecimiento a Fredy Coronas, Biólogo Cipriano Balderas, M. en C. Timoteo Olamendi, Candidato a Doctor Fernando Zamudio, técnicos académicos del laboratorio que me auxiliaron en los trabajos de purificación y secuenciación de los péptidos reportado en esta tesis.

Agradezco a la Dra Elizabeth Mata y a todo el personal que labora en el bioteno del Instituto de Biotecnología por las facilidades prestadas en el manejo y manutención de los animales utilizados en este trabajo.

Dedicado a mi Padre y mi Madre, a mi Abuela y a todas aquellas personas que ahora viven en mis recuerdos.

En especial dedico y agradezco a todos aquellos que una u otra forma colaboraron para que este trabajo se haya consumado. A mis padres por su apoyo incondicionado, a mis hermanos Francisco, Ersilia, Lino, Rodrigo y Gildardo que no necesariamente es el orden en el que terminan en un juego de RISK. A todos mis profesores sin excepción Rocio, Lucha, Rosario, Blanca, Teresa y Guadalupe que sentaron las bases y hábitos académicos presentes en mi persona. A Juan Zepeda, Enrique Aguilera y Francisco Ramos profesores que influyeron profundamente en mi gusto por la ciencia y en mi decisión de estudiar la carrera de Biología. Al profesor Alberto Urrutia que me enseñó que es normal y muy sano el dudar de lo ya establecido, a la Bióloga Martha del Valle por abrirme la puerta del excitante mundo de la investigación científica en México. A los profesores de la Facultad de Ciencias en general, y en particular a Guillermo Salgado, Fernando Mendoza, Sergio López y Eduardo Morales por ser maestros y compañeros mas allá del salón de clase, a Ma. Teresa Benitez por mostrarme que la biología puede explicarse desde puntos de vista totalmente insospechados a Nora Galindo por demostrarme involuntariamente que ser Biólogo es una pasión que se muestra en todo momento y en cualquier lugar donde uno se encuentre. Al Dr. René Drucker, al Dr. Possani y la Dra. Emma Calderón por enseñarme el lado personal del científico mexicano.

Dedico este trabajo a mis buenos compañeros de escuela en todos sus niveles y mejores amigos: Arturo, Felix, Manuel, Flavio, Erick, Raymundo, Soriel, Jorge y Francisco. A mis compañeros de facultad y de dificultades Carlos Galindo, Lenin Rios, Leticia Luna, Bárbara Reachy, Luis Alcántara, Edgar Camacho, Idalia Villalpando, Silvia Baranda, Eva Mendoza, Ricardo Reyes, Sara Paz, Laura Contreras, Juan Lagunilla, Sol Galicia, Rosario Santoyo, Angelica Becerril, Ma. Teresa Zariñan y especialmente a Indira García.

Santoyo, Angelica Becerril, Ma. Teresa Zariñan y especialmente a Indira García.

A mis compañeros de laboratorio Hugo Merchant, Jose Luis Mendoza, Anabel Anguiano del Instituto de Fisiología Celular. A Vanesa Olivares, Adriana Valdez, Selene Zárate, Jimena Pérez-Vargas, Gabriela Cosio, Gerardo Medina, Gabriel Seañez, Mauricio Trujillo, Linda Solaris, Consuelo García, Bárbara Selisko, Fredy Coronas, Fernando Zamudio, Cipriano Balderas, Alexei Licea y Fernando Martínez. De forma muy especial quiero dedicar este trabajo a Alfredo Torres, Ricardo Rodríguez de la Vega y Renaud Condè por brindarme una amistad y compañerismo en grados y proporciones casi sectarias.

Pero con el mayor gusto del que soy capaz dedico y agradezco a Laura Flores, Gerardo, Veronica, Saul y Alfonso que son la más grande fuente de motivación que poseo en este momento .

A todos los omitidos anteriormente que en este momento terniman de leer la dedicatoria.

## INDICE

CONTENIDO	PAGINA
RESUMEN	ii
ABREVIATURAS	iii
LISTADO DE FIGURAS	v
INTRODUCCION	1
ANTECEDENTES	15
OBJETIVOS	24
MATERIAL Y METODOS	25
RESULTADOS	32
DISCUSION	44
CONCLUSIONES	51
PERSPECTIVAS	52
REFERENCIAS	53

## RESUMEN.

Se purificó la fracción Cn F.II.5 del veneno del alacrán mexicano *Centruroides noxius* (Hoffmann), utilizando distintas estrategias cromatográficas. La fracción Cn F.II.5 fue a su vez repurificada por CLAR para obtener y secuenciar parcialmente los componentes presentes en dicha fracción. Se reportan 19 secuencias parciales o totales presentes en la Cn F.II.5 de las cuales dos muestran gran identidad con toxinas contra canales de potasio y el resto presenta similitudes mayores a 50% en el extremo amino terminal con toxinas contra canales de sodio. Se evaluó la toxicidad de la fracción Cn F.II.5 tanto en mamíferos (ratones) y crustáceos (cochinillas). Los resultados de estos retos muestran una baja toxicidad de la fracción en ambos casos; las DL<sub>50</sub> estimadas tanto en ratones como en cochinillas presentan valores muy similares. Por otro lado se desarrollaron esquemas de inmunización en ratones y en conejo usando como antígeno la fracción Cn F.II.5. Los ratones inmunizados fueron retados *in vivo* contra el veneno total soluble de *C. noxius* y la toxina Cn2 observando fenómenos de hipersensibilización. El suero policlonal de conejo se utilizó para valorar su reactividad con cada uno de los componentes presentes en la fracción y compararla con la mostrada contra Cn2. Los péptidos con mayor porcentaje de identidad a Cn2 fueron los que mostraron menos reactividad hacia el antisuero y la Cn2 mostró una muy débil reacción cruzada. El BCF2, anticuerpo monoclonal que bloquea la acción tóxica de Cn2, se utilizó para comparar su reactividad antigénica hacia los péptidos componentes de la Cn F.II.5. Ninguno de los péptidos purificados de la Cn F.II.5 mostró homología antigénica con la Cn2. Por último se valoró la capacidad neutralizante *in vitro* del suero de conejo anti Cn F.II.5 contra la Cn2. El suero hiperinmune de conejo es capaz de neutralizar 7.5 DL<sub>50</sub> por ml.

## ABREVIATURAS

A	Absorbancia
AaH II	Toxina II de <i>Androctonus australis</i>
ACF	Adyuvante completo de Freund
AIF	Adyuvante incompleto de Freund
BCF2	Anticuerpo monoclonal contra Cn2
Bot XIV	Toxina XIV de <i>Buthus occitanus tunetanus</i>
BSA	Seroalbúmina bovina (siglas en inglés)
CDR	Región Determinante de la Complementariedad (siglas en inglés)
CLAR	Comatografía líquida de alta resolución
CMH II	Complejo mayor de histcompatibilidad tipo II
cm	centímetro
Cn1	Toxina 1 de <i>Centruroides noxius</i>
Cn2	Toxina 2 de <i>Centruroides noxius</i>
Cn3	Toxina 3 de <i>Centruroides noxius</i>
Cn4	Toxina 4 de <i>Centruroides noxius</i>
Cn5	Toxina 5 de <i>Centruroides noxius</i>
Cn6	Toxina 6 de <i>Centruroides noxius</i>
Cn7	Toxina 7 de <i>Centruroides noxius</i>
Cn8	Toxina 8 de <i>Centruroides noxius</i>
Cn9	Toxina 9 de <i>Centruroides noxius</i>
Cn10	Toxina 10 de <i>Centruroides noxius</i>
DL <sub>50</sub>	Dosis letal media
ELISA	Ensayo inmunológico ligado a enzima (siglas en inglés)
Fab <sub>2</sub>	Fracción bivalente de adhesión al antígeno
Fc	Fracción cristalizable
Fv	Fracción variable
g	gramos
HC	Fracción constante de la cadena pesada (siglas en inglés)
HCl	ácido clorhídrico
hr	hora
HV	Fracción variable de la cadena pesada (siglas en inglés)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno
IL	Interleucina
Ig	Inmunoglobulina
IgG	Inmunoglobulina tipo G
IgE	Inmunoglobulina tipo E
kDA	kilodalton
kg	kilogramos

LC	Fracción constante de la cadena ligera
LV	Fracción variable de la cadena ligera
M	molar
mg	miligramos
min	minutos
ml	mililitros
mM	milimolar
MTX	Margatoxina
NaCl	cloruro de sodio
nm	nanómetros
NMR	Resonancia Magnética Nuclear (siglas en inglés)
NTX	Noxiustoxina
NTX2	Noxiustoxina 2
PBS	Amortiguador salino de fosfatos (siglas en inglés)
pH	Logaritmo negativo de la concentración de Hidrogeno
RF <sub>c</sub>	Receptor de la fracción constante de tipo E
TsNTxP	Fracción no tóxica del alacrán de <i>Tytius serrulatus</i>
uv	ultravioleta
v	volumen
23C6	Anticuerpo monoclonal contra AaH II
°C	grados centígrados
µg	microgramos
µl	microlitros

## LISTADO DE FIGURAS.

FIGURA	PAGINA
1. Modelo tridimensional de Cn2.	6
2. Modelo del canal de sodio y el sitio de unión de algunas toxinas contra canales de sodio.	7
3. Modelo de una inmunoglobulina tipo G.	11
4. Cromatografía de exclusión molecular del veneno soluble de <i>Centruroides noxius</i> .	33
5. Cromatografía de intercambio iónico de la fracción F.II de <i>Centruroides noxius</i> .	34
6. Cromatografía por CLAR de la fracción Cn F.II.5 de <i>Centruroides noxius</i> .	35
7. Titulación de anticuerpos policlonales de ratón y conejo contra la fracción Cn F.II.5.	39
8. Reactividad cruzada por prueba de ELISA del antisuero de conejo anti Cn F.II.5 contra los componentes purificados de la fracción Cn F.II.5 y Cn2.	40
9. Reactividad cruzada por prueba de ELISA del anticuerpo BCF2 contra los componentes purificados de la fracción Cn F.II.5 y Cn2.	41

## TABLA

## PAGINA

1. Toxinas purificadas del veneno de <i>Centruroides noxius</i> reportadas en la literatura.	19
2. Esquemas de inmunización con Cn F.II.5 en ratones y conejo.	28
3. Secuencias completas y parciales de los componentes purificados de la fracción Cn F.II.5.	36
4. Toxicidad de la fracción Cn F.II.5 en mamíferos y crustáceos.	38
5. Protección <i>in vivo</i> a ratones inmunizados con Cn F.II.5 contra veneno total de <i>Centruroides noxius</i> y Cn2.	42
6. Neutralización <i>in vitro</i> a ratones inyectados con Cn2 y antisuero policlonal de conejo anti Cn F.II.5.	43

## **INTRODUCCION.**

### **Generalidades de los alacranes y escorpionismo.**

Los alacranes están taxonómicamente ubicados dentro del Phylum Arthropoda, la Clase Arachnida y Orden Scorpionidae. Dentro de las varias Familias de este Orden la Familia Buthidae adquiere gran importancia para el hombre pues contiene a todos los alacranes venenosos contra mamíferos del mundo. En Norteamérica y más específicamente en México sólo 6 especies y 2 subespecies de las 30 especies reportadas del Género *Centruroides sp.* son consideradas peligrosas para el hombre, pues su veneno es neurotóxico y capaz de poner en riesgo la vida de las personas picadas por ellos; este problema de salud pública es denominado médicamente como escorpionismo (Dehesa-Dávila y Possani, 1994).

El escorpionismo se presenta muy frecuentemente en el país, en particular los estados del Pacífico y Sur de la República son los que registran mayor incidencia. De hecho es en México donde se presenta el mayor número de accidentes por picadura de alacrán, cerca de 200 000 casos por año, y de ellos el 0.1% son mortales (Dehesa-Dávila y Possani, 1994, Calderón-Aranda *et al.* 1996).

Aún cuando se han desarrollado métodos eficientes para tratamiento de pacientes con síntomas de envenenamiento por picadura de alacrán, éstos no son suficientes pues existen zonas donde el servicio médico es escaso, ineficiente o incluso inexistente y aunado a esto la falta de conocimiento de la gente sobre las medidas necesarias a realizar cuando sucede un accidente de esta naturaleza, hace que el porcentaje de mortandad se incremente.

En México se producen dos sueros antialacránicos, uno elaborado por la Secretaría de Salud Pública y otro por un laboratorio farmacéutico particular (Bioelón S.A. de C.V.). En ambos casos estos antivenenos se obtienen mediante la inmunización de caballos. Estos son inyectados con macerados de telson de los

alacranes, centrifugados con el fin de eliminar residuos celulares y mucosidades, utilizando la fracción soluble para inocular al animal. Este antiveneno obtenido del suero de caballo está compuesto por inmunoglobulinas G, purificadas y digeridas enzimáticamente, presentando las fracciones de unión al antígeno (Fab<sub>2</sub>), polivalentes para todas las especies peligrosas del Género *Centruroides* sp. presentes en México (Flores, 1963; Calderón-Aranda *et al.* 1996). La polivalencia del suero, (capacidad del suero para bloquear la acción del veneno de diferentes especies de alacrán), se obtiene de inmunizaciones independientes usando el macerado de télsones de una sola especie en cada animal inmunizado; télsones de *C. noxius*, *C. limpidus limpidus* y *C. suffusus suffusus*. Posteriormente se combinan los sueros dirigidos hacia los diferentes venenos. Este antiveneno en general ha mostrado efectividad, sin embargo, este método de obtención implica que en el conjunto de células maceradas y centrifugadas se presente una gran cantidad de elementos inocuos y no tóxicos que son inyectados en los caballos, generando anticuerpos específicos irrelevantes para la protección. Estos anticuerpos colaboran mínimamente en la neutralización de los péptidos tóxicos y aumentan la posibilidad de generar reacciones secundarias indeseables en el paciente como la enfermedad del suero (Licca *et al.* 1996a). Sumado a esto, el uso de antígenos tóxicos limita grandemente su aplicación pues sólo es posible administrar muy pequeñas cantidades, además de que la salud de los animales se ve afectada disminuyendo la posibilidad de utilizarlos por largo tiempo o disminuyendo su respuesta inmunológica (Landon y Smith, 1996). Las anteriores son algunas causas que le dan importancia al uso de técnicas adecuadas para la purificación de toxinas del veneno de diferentes especies de alacranes de México con el fin de obtener elementos puros con actividad específica hacia mamíferos (Calderón-Aranda *et al.* 1993).

Los efectos del veneno de alacrán sobre una persona pueden variar y no necesariamente tienen que presentarse todos los síntomas. Es necesario observar una serie de variables que implican tanto a las condiciones del individuo: peso, edad, estado de salud, sensibilidad al veneno, zona y número de piquetes sufridos;

así como del alacrán: especie y cantidad de veneno inyectado. Los principales síntomas se presentan en los primeros veinte minutos después de la picadura. Los más comunes a nivel local son: intenso dolor, seguido por ardor o comezón y una sensación de adormecimiento que puede llegar a expandirse en la región corporal de la picadura y durar hasta varios días; los síntomas generales y más importantes para valorar si se requiere el uso del suero antialacránico son: lagrimeo, secreción nasal, sensación de pelos en la garganta, dificultad para respirar y tragar, tos, disfonía y disfagia, hiperexcitabilidad, sialorrea y vómito. En casos de envenenamiento severo, las principales causas de muerte son provocadas por edema pulmonar o problemas cardíacos ( Dehesa-Dávila *et al.* 1994; Calderón-Aranda *et al.* 1996).

Los grupos poblacionales con mayor riesgo de envenenamiento severo son los niños menores de 5 años y los ancianos. En el tratamiento de la picadura se recomienda la aplicación del antisuero cuando se presentan dos o más síntomas generales en el paciente (Calderón-Aranda *et al.* 1996).

### **Bioquímica, clasificación y estructura tridimensional de las toxinas de alacrán.**

Los principales componentes activos del veneno de alacrán son enzimas y pequeños péptidos de entre 35 y 70 residuos de aminoácidos. Estos péptidos son denominados toxinas por ser los responsables de los efectos letales o tóxicos del veneno, pues afectan a los tejidos excitables de la víctima (tejido muscular y nervioso). Las toxinas son capaces de modificar la actividad de canales iónicos de dichas células (Rochat *et al.* 1979; Carbone *et al.* 1982).

La clasificación de las toxinas de alacrán se basa en distintas características estructurales y fisiológicas de estos polipéptidos, como son:

a) Selectividad de acción sobre distintos canales iónicos y los efectos que producen en estos: existen toxinas de alacranes capaces de afectar a canales de

potasio, sodio, cloro o calcio (Catterall *et al.* 1976, Carbone *et al.* 1982, Debin *et al.* 1993, Valdivia *et al.* 1992). Algunas toxinas pueden bloquear el paso de iones como sucede con las toxinas contra canales de potasio (Carbone *et al.* 1982, Nieto *et al.* 1996). Dentro de las toxinas dirigidas a canales de sodio algunas retardan la inactivación, mientras que otras modifican la activación de los canales; un rasgo importante en la clasificación de las toxinas de sodio observa también la zona del canal con la cual interactúan (Couraud *et al.* 1982, Meves *et al.* 1984, Caterall *et al.* 1991).

b) Longitud de la cadena: la mayoría de las toxinas de cadena corta poseen tres puentes disulfuro contiene entre 30 y 40 residuos de aminoácidos (Possani 1984; Nieto *et al.* 1996) y actúan sobre canales de potasio. En últimas fechas se han reportado dos toxinas de cadena corta que presenta cuatro puentes disulfuro (Olamendi-Portugal *et al.* 1996; Kharrat *et al.* 1996 b).

Las toxinas de cadena larga, de entre 60 y 70 residuos de aminoácidos con cuatro puentes disulfuro, afectan los canales de sodio. Estas se han clasificado en base a las características de unión al canal, a la especie en cual presenten una mayor afinidad y a los efectos que producen en la célula. Por ejemplo, existen toxinas contra canales de sodio que afectan a canales de mamíferos. Estos péptidos se subdividen en: toxinas tipo  $\alpha$  o tipo  $\beta$  de acuerdo al sitio de unión al canal y sus efectos sobre el mismo. Las toxinas de tipo  $\alpha$  se unen al sitio 3 del canal de sodio dependiente de voltaje y retardan la inactivación; éstas toxinas se encuentran presentes principalmente en los venenos de las especies de alacranes del Viejo Mundo. Las toxinas de tipo  $\beta$  se unen al sitio 4 del canal y modifican su activación, en general ésto caracteriza a las toxinas de los alacranes de América (Couraud *et al.* 1982; Wheeler *et al.* 1983).

c) Especificidad de acción de las toxinas contra células de distintas especies: una misma toxina se adhiere con distinta afinidad a un mismo tipo de canal dependiendo si éste pertenece a células de mamífero, insecto o crustáceo, e incluso

es tejido dependiente, dadas las diferencias estructurales que presentan los canales iónicos en función de la célula que los expresa. Se han llegado a describir algunas toxinas dirigidas tanto hacia canales de sodio de mamíferos como de insectos por presentar valores comparables de unión a los canales de ambas especies (Gordon *et al.* 1996, Loret *et al.* 1991).

Las toxinas contra insectos que se unen a canales de sodio están clasificadas en tres grupos:

1) Las toxinas contra insectos que son altamente tóxicas (ensayos realizados en cucarachas *Periplaneta americana*), afectan la inactivación del canal (Gordon *et al.* 1996). 2) Las toxinas depresoras producen en el insecto parálisis flácida en su sistema muscular, mediante el bloqueo de la corriente (Lebreton *et al.* 1994). 3) Las toxinas excitatorias producen una rápida parálisis espasmódica y se unen al canal en forma independiente del voltaje (Zlotkin *et al.* 1991).

Aun cuando se han reportado un buen número de toxinas distintas de diferentes especies, a todas se les observa un patrón conservado en lo que a su estructura tridimensional se refiere. Es decir, todas las toxinas hasta ahora descritas tienen tres o cuatro puentes disulfuro dispuestos de manera similar y un motivo estructural repetido que consta de una hélice alfa y dos o tres hebras antiparalelas formando una hoja beta plegada, conocido como patrón  $\alpha$ - $\beta$  estabilizado por cisteínas (Kobayashi *et al.* 1991) (Fig 1.). Las secuencias de aminoácidos pueden variar, pero presentan residuos conservados, como la lisina 35 y el patrón repetitivo de los enlaces disulfuro. Se distinguen dos segmentos conservados en el centro hidrofóbico entre la  $\alpha$  hélice y la parte media de la hoja  $\beta$  (Cys-x-x-x-Cys, Cys-x-Cys; donde x indica un residuo variable) e incluso se pueden distinguir sitios hidrofóbicos basados en el agrupamiento de una serie de aminoácidos que, aún cuando no se encuentren en continuidad en su estructura primaria, el plegamiento del péptido los mantiene cercanos. Se reconoce un centro hidrofóbico de la proteína conformado por los residuos de cisteínas y algunos aminoácidos

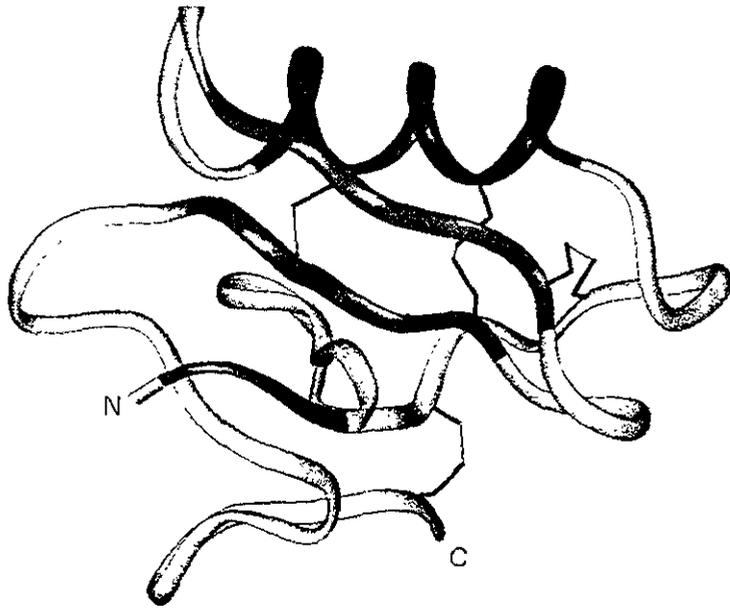


Fig. 1 Modelo tridimensional de la toxina Cn2 del alacrán *C. noxius*, determinado por NMR. Se aprecia, en color negro, la  $\alpha$ -hélice unida por dos puentes disulfuro a la segunda hebra de la hoja  $\beta$  antiparalela, en gris obscuro. Tomado de Pintar *et al.*, 1998.

hidrofóbicos, una región hidrofóbica constituida por residuos aromáticos en la hoja  $\beta$  de cara al solvente y una región de carga positiva a un costado de la molécula en la región carboxilo terminal.

Todos estos puntos podrían estar involucrados en la funcionalidad y especificidad de las toxinas hacia los canales y el tipo de células sobre las cuales actúan (Almassy *et al.* 1983, Fontecilla-Camps *et al.* 1980, Pintar *et al.* 1998).

### **Canales iónicos: principales blancos de acción de las toxinas de alacrán.**

En definición los canales iónicos son proteínas transmembranales, incrustadas en la bicapa lipídica de la membrana celular; están unidos a otras proteínas membranales o a elementos del citoesqueleto intracelular. Los canales iónicos son macromoléculas de gran longitud pues se componen de 1800 a 4000 residuos de

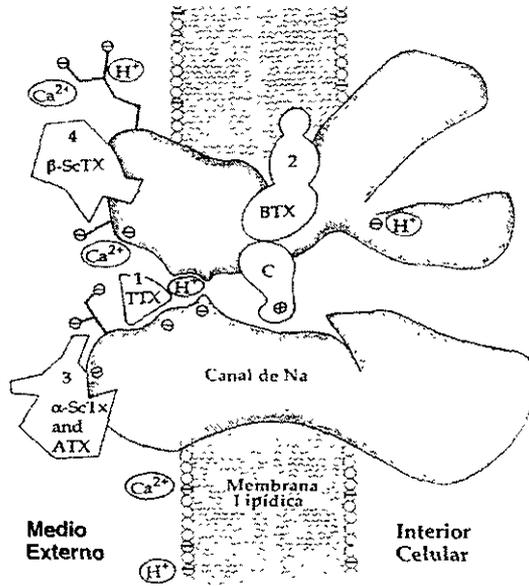


Fig 2 Modelo de unión del canal de Sodio y los distintos sitios de unión de toxinas que actúan sobre el canal. 1. Tetratodtoxina, 2. Batracotoxina, 3. Toxinas  $\alpha$  de alacrán y de anemona, 4. Toxinas  $\beta$  de alacrán, C anestésicos locales. Tomado de Hille, 1992.

aminoácidos aproximadamente, organizados en una o varias cadenas polipeptídicas y con varios cientos de residuos de azúcares, en forma de cadenas de oligosacáridos, unidos covalentemente a ciertos aminoácidos localizados en las zonas de la proteína que se encuentran en la cara externa de la membrana (Catterall *et al.* 1988; Unwin *et al.* 1989).

El canal posee permeabilidad selectiva, pues restringe el movimiento de los iones a una sola especie. El canal presenta una región conocida como poro, el cual está compuesto de cuatro subunidades repetidas. Cada una de las subunidades tiene dos hélices  $\alpha$ , donde una de las hélices  $\alpha$  se ubica hacia la cara de la membrana y la otra se encuentra hacia la luz del poro. Las cuatro subunidades se acoplan formando un cono invertido cuando se encuentra el canal en reposo y cuando se abre las hélices modifican sus ángulos para abrir el conducto del poro a manera la apertura de un botón de flor. La proteína forma un conducto acuoso que cruza completamente la bicapa de la membrana; este conducto es más ancho que el

ion. La presencia de una cavidad acuosa en el interior del conducto y los residuos dipolares de las hélices  $\alpha$  externas permiten que el ion atraviese la zona electrostática hasta el filtro de selectividad; mientras que los aminoácidos hidrofóbicos de las hélices  $\alpha$  internas se ubican en interfase con la bicapa lipídica. Muy cerca del filtro de selectividad se ubican dos cationes a distancias muy cercanas, la repulsión generada por este par de iones promueven la rápida conducción y alta selectividad (Declan *et al.* 1998). La posibilidad de apertura o cierre del canal está regida por un sensor, en el caso de los canales dependientes de voltaje, el sensor posee varios grupos de aminoácidos cargados que se mueven dentro del campo eléctrico de la membrana durante la apertura (revisado por Hille 1992).

El canal de sodio presente en el tejido muscular y nervioso de ratón es una glucoproteína compuesta de alrededor de 2000 residuos aminoácidos y tiene un peso cercano a 230 kDa aportado por una cadena polipeptídica mayor, subunidad  $\alpha$ , y dos pequeñas subunidades  $\beta$  de 36 y 40 kDa (Barchi *et al.* 1988, Caterall *et al.* 1988, Trimmer y Agnew 1989). Adicionalmente a la cadena se han encontrado oligosacáridos y ácidos grasos unidos covalentemente (Agnew *et al.* 1978; Miller *et al.* 1983).

La subunidad mayor del canal posee una estructura repetitiva de alrededor de 300 a 400 residuos aminoácidos; este motivo se repite cuatro veces en los más de 1800 residuos que conforman la subunidad  $\alpha$ . Cada uno de estos motivos repetitivos internos incluyen múltiples segmentos transmembranales, ubicados por predicción sobre la base de la hidrofobicidad de los residuos de aminoácidos; el gráfico de predicción de hidrofobicidad indica que la parte amino terminal del canal no se encuentra dentro de la membrana. El poro transmembranal está formado por los cuatro segmentos transmembranales repetidos en la unidad  $\alpha$  y el sensor de voltaje se ubica en el segmento S4, que tiene ocho residuos cargados positivamente cada tercer residuo, (Stühmer *et al.* 1989, Auld *et al.* 1990).

## **Sistema inmune y acción del veneno en el cuerpo.**

El sistema de defensa en la mayoría de los vertebrados es una compleja combinación de células y proteínas especializadas para hacer frente a elementos patógenos y sustancias extrañas que logran penetrar en el cuerpo. Este sistema es conocido como sistema inmune.

Cuando un elemento dañino (infección bacteriana, virus, proteínas tóxicas o extrañas) ingresa al cuerpo se desencadenan una serie de eventos para eliminarlo. La respuesta contra este agente patógeno, también llamado antígeno, se realiza en dos niveles distintos: uno a nivel humoral y otro a nivel celular. El organismo es capaz de levantar una respuesta inmune celular donde las células componentes del sistema inmunitario, como los linfocitos, macrófagos y leucocitos entre otros, son estimulados para hacer frente y eliminar dicho antígeno. Existen también una serie de proteínas que están diseñadas para realizar funciones de reconocimiento, activación y regulación de la respuesta inmune; este tipo de respuesta es conocida como respuesta inmune humoral. Ambos niveles de respuesta se combinan y complementan actuando conjuntamente en la mayoría de las enfermedades que sufre el organismo (revisado por Abbas *et al.* 1994).

Los antígenos son reconocidos por un receptor de los linfocitos B, llamado inmunoglobulina (Ig); esta proteína tienen un papel primordial en el sistema inmune, pues está diseñada para el reconocimiento altamente específico de un gran número de proteínas extrañas al cuerpo. Las Ig, también conocidas como anticuerpos, son componentes humorales del sistema inmune. Los anticuerpos están involucrados en el reconocimiento de antígenos que no ingresan a las células sino que se mantienen en los fluidos del cuerpo o en el medio extracelular de algunos órganos, como en el caso de infecciones bacterianas o toxinas producidas por éstas. La forma de cómo las Ig logran reconocer la gran cantidad de epítopes de los antígenos se explica por una serie de genes que son seleccionados y unidos en distintas formas para la síntesis del anticuerpo dando como resultado varios cientos de millones de combinaciones posibles (revisado por Benacerraf y Unanue 1986).

Las Ig son proteínas con un peso molecular de entre 150 y 900 kDa, ya que algunos tipos de Ig se presentan en forma polimérica (2 unidades en el caso de las Ig tipo A o pentamérica como las Ig del tipo M). Una molécula monomérica de Ig está compuesta por cuatro cadenas peptídicas. Estas proteínas tienen dos cadenas cortas llamadas cadenas ligeras y dos cadenas largas, llamadas pesadas, que conforman un anticuerpo funcional (Alzari *et al.* 1988).

En los mamíferos se han descrito dos tipos de cadenas ligeras:  $\lambda$ (lambda) y  $\kappa$ (kappa), y cinco diferentes tipos de cadenas pesadas:  $\alpha$ (alfa),  $\gamma$ (gama),  $\mu$ (mu),  $\epsilon$ (épsilon) y  $\delta$ (delta). Las cadenas ligeras están divididas en dos porciones: el fragmento ligero variable (LV) y el fragmento ligero constante (LC); el fragmento LV es diferente en cada uno de los linfocitos B, pues existe una secuencia determinada para cada antígeno y tiene como función el reconocimiento de éste, conjuntamente con la fracción variable de las cadenas pesadas (HV). La LC puede ser sólo de los tipos anteriormente mencionados ( $\lambda$  o  $\kappa$ ); estos fragmentos se relacionan con las funciones específicas del anticuerpo en el sistema inmune. En un anticuerpo las dos cadenas ligeras son del mismo tipo ya sean dos cadenas  $\lambda$  o dos del tipo  $\kappa$  (Ravetch y Kinet 1991).

Las cadenas pesadas también presentan fragmentos definidos; poseen una fracción variable (HV) distinta en cada célula productora de anticuerpos y al asociarse con la cadena ligera y el primer dominio de la cadena pesada, conforman el fragmento de pegado al antígeno conocido como Fab. La porción constante que está relacionada con la actividad específica de cada anticuerpo junto con el segmento LC forma la fracción cristalizable (Fc) del anticuerpo. Entre la Fab y la Fc de un anticuerpo se ubica un segmento conocido como región bisagra, en este dominio existen varios enlaces disulfuro que unen las cadenas ligeras con cada una de las cadenas pesadas y unen también a ambas cadenas pesadas (Fig. 3) (Burton *et al.* 1987).

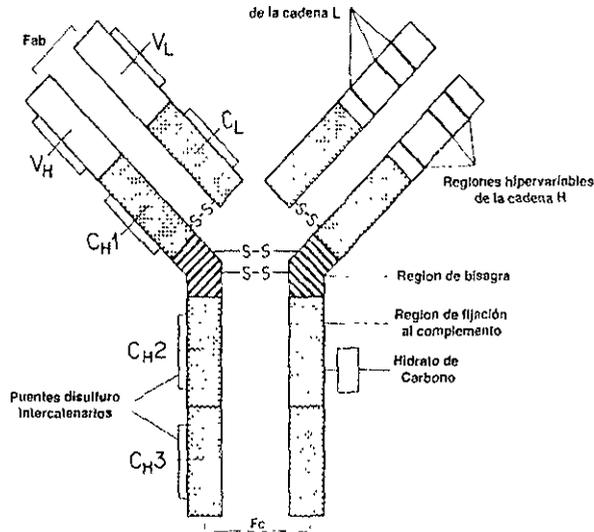


Fig. 3 Modelo de Inmunoglobulina tipo G. se muestran las fracciones y subunidades que la componen y algunas zonas relevantes de la proteína. Fracción variable en blanco. Fracción constante punteada, región bisagra en líneas. Tomado de Benacerraf y Unanue, 1986.

Cuando los linfocitos B no han sido estimulados por efecto de un antígeno se ubican en su mayoría en los ganglios linfáticos o en el bazo y sólo se encuentra en circulación un pequeño porcentaje. Al ingresar el antígeno en el organismo se mantiene circulando en el torrente sanguíneo hasta ser reconocido por un receptor de los linfocito B; este receptor es una Ig con una porción peptídica hidrofóbica que lo fija en la membrana de la célula; los linfocitos B no estimulados presentan en su membrana mayoritariamente Ig tipo M o tipo D (revisado por Benacerraf y Unanue 1986).

Una vez que se une el antígeno al receptor complementario, el linfocito se dirige hacia los ganglios linfáticos y es allí donde éste se diferencia hacia células plasmáticas. Estas células cambian el tipo de cadena pesada de la Ig que expresan hacia  $\gamma$  o  $\alpha$ , se multiplican con gran velocidad y eliminan la secuencia que mantiene a la Ig unida a la membrana convirtiendo a las Ig en proteínas secretoras; estos anticuerpos específicos para el antígeno en cuestión se liberan en gran número en el

sistema linfático y circulatorio con la finalidad de reconocer, atrapar y neutralizar los antígenos (revisado por Benacerraf y Unanue 1986).

Los anticuerpos se unen a un antígeno mediante acoplamientos moleculares muy estrechos y altamente específicos. Cada anticuerpo en su Fab posee zonas hipervariables; estas regiones muestran una elevada variación comparada con otros segmentos peptídicos conocidos como residuos estructurales. Se ha demostrado que dichas regiones hipervariables son las responsables de la unión al antígeno y se denominan como regiones determinantes de la complementariedad. Los residuos de aminoácidos ubicados en las CDR poseen ciertas características que propician la unión de éstos con aminoácidos específicos presentes en el antígeno (Amit *et al.* 1986).

Se pueden observar rasgos característicos en el proceso de reconocimiento y formación del complejo antígeno-anticuerpo, como la alta complementariedad entre éstos, que se pone de manifiesto en la completa exclusión de moléculas de agua en la interface, pues ninguna cavidad se puede observar entre las dos superficies. La complementariedad de las cargas es otro fenómeno distinguible en la formación del complejo antígeno-anticuerpo. Se puede observar una disposición de aminoácidos en el anticuerpo que complementa a las cargas mostradas por residuos del antígeno, con lo que se propicia la neutralización de las mismas al formar enlaces débiles de tipo iónico conocidos como puentes salinos; estos puentes salinos pueden ser modificados en presencia de moléculas de agua pues éstas disipan la acción de las cargas de las proteínas. Los puentes de hidrógeno que se forman entre ambas moléculas también juegan un papel importante en la estabilización del complejo; experimentos donde mutan residuos específicos para eliminar uniones por puentes de hidrógeno disminuyen fuertemente las afinidades del anticuerpo por el antígeno. Por último, la elasticidad, accesibilidad y antigenicidad del antígeno también influyen en gran medida para aumentar o disminuir las afinidades del anticuerpo (revisado por Sheriff *et al.* 1990; revisado por Davies *et al.* 1988).

Pero no sólo los linfocitos B atacan al patógeno produciendo anticuerpos

contra él, sino que tienen otra vía de ataque donde el complejo formado por el antígeno y el receptor de la célula es introducido al citoplasma del linfocito. El antígeno es digerido y procesado para presentar un corto fragmento del mismo en combinación con una molécula conocida como complejo mayor de histocompatibilidad del tipo II (CMH II). Este nuevo complejo es ubicado nuevamente en la superficie de la membrana celular para ser presentado al receptor de los linfocitos T. Hay varias clases de éstos: existen los citotóxicos que se encargan de eliminar a células infectadas por virus u otros patógenos que actúan en el interior de éstas; los linfocitos T ayudadores y supresores son células del sistema inmunitario cuya función es la de regular la acción de otras células como los propios linfocitos B, mastocitos, células dendríticas, macrófagos, etc., mediante la producción de sustancias liberadas en el torrente sanguíneo conocidas como interleucinas (IL) y factores de crecimiento que promueven o reprimen la expresión y actividad de la respuesta inmune celular (revisado por Engelhard 1994).

Aún cuando el sistema inmunitario es extremadamente eficiente ante ataques de antígenos y organismos patógenos, todo este complejo mecanismo de acción puede necesitar un tiempo de estimulación y activación de varios días y hasta semanas (Abbas *et al.* 1994). En el caso de venenos de animales como artrópodos o reptiles la efectividad del sistema inmune se ve disminuída, pues los principales componentes proteínicos del veneno (toxinas que actúan sobre canales iónicos) son péptidos que fácilmente "burlan" al sistema inmune en base a los tiempos que necesitan para ejercer su efecto neurotóxico o citotóxico. Estas velocidades rebasan la capacidad del organismo para levantar una respuesta inmune en contra de dichas toxinas.

En estudios de farmacocinética se reportan tiempos de absorción del veneno del alacrán *Tytius serrulatus* por el sistema circulatorio, del 75% en menos de 15 minutos, cuando el veneno ingresa por vía subcutánea (Santana *et al.* 1996). Los órganos que presentaron la mayor concentración en este tiempo fueron el riñón y el bazo, mientras que órganos como el corazón, pulmón, hígado e intestinos presentan la mayor concentración del veneno en los 30 minutos posterior a la administración.

Los niveles de concentración se ven dramáticamente disminuidos hasta dejar de ser detectables a los 120 minutos (Ismail *et al.* 1993, Revelo *et al.* 1996).

Sin embargo, las toxinas son proteínas capaces de ser reconocidas por el sistema inmune; además pueden levantar una respuesta humoral eficaz y específica en contra de dicho péptido (revisado por Abbas *et al.* 1994). Como ya se ha mencionado anteriormente, el tratamiento más efectivo utilizado en la actualidad para casos de picadura de alacrán es el uso de antivenenos obtenidos de suero de animales inmunizados con el veneno del artrópodo. Aún cuando la inmunización presenta una serie de dificultades por ser antígenos altamente tóxicos, con posibilidades de tener complicaciones de sensibilización o anafilaxia, la seroterapia ha logrado reducir el número de víctimas mortales a menos del 1% del total de accidentes en nuestro país (Dehesa-Dávila y Possani 1994).

Para conseguir un antiveneno de buena calidad y a precios razonables es necesario desarrollar un protocolo de inmunización capaz de utilizar cantidades pequeñas de antígeno y obtener una respuesta inmune de alta especificidad y afinidad contra las toxinas y a la vez conseguir que los efectos tóxicos del veneno sobre los animales disminuyan.

## ANTECEDENTES

### El veneno de *C. noxius*.

El alacrán mexicano *C. noxius* que habita en el estado de Nayarit es considerado como el más venenos del país; la  $DL_{50}$  es de 5  $\mu$ g de veneno total por cada 20 g de ratón por vía intraperitoneal (Dent *et al.* 1980). Sólo en la ciudad de Tepic entre los años de 1983 a 1989 los hospitales de la Secretaría de Salud reportaron un total de 9526 picaduras, obteniendo 1588 accidentes en promedio anual (Dehesa-Dávila y Possani, 1994).

Los primeros estudios bioquímicos hechos sobre el veneno del alacrán *C. noxius* se realizaron en este laboratorio (Dent *et al.* 1980). A la fecha se han caracterizado más de 12 toxinas distintas responsables de los efectos tóxicos del veneno tanto en mamíferos como en artrópodos. Aún cuando se han descrito cuatro toxinas que afectan canales de potasio, la mayoría de las toxinas reportadas están dirigidas hacia canales de sodio. Existen seis toxinas de este alacrán secuenciadas totalmente y cinco secuencias parciales reportadas en la literatura que afectan estos canales. Todas se han reconocido como toxinas de tipo  $\beta$ ; estas toxinas actúan sobre el sitio 4 del canal y afectan su activación (Dent *et al.* 1980, Possani *et al.* 1981 a, Zamudio *et al.* 1992, Vázquez *et al.* 1993; Valdivia *et al.* 1994, Selisko *et al.* 1996; García *et al.* 1997).

Todas las toxinas del veneno de *C. noxius*, reportadas hasta la fecha, se encuentran en la fracción F.II, obtenida mediante un primer paso cromatográfico de exclusión molecular. Esta fracción es la única que presenta efectos letales en mamíferos (Possani *et al.* 1981 a).

La cromatografía de esta fracción, en una columna de intercambio iónico da como resultado 14 subfracciones, de las cuales sólo las últimas ocho muestran actividad tóxica en ratones en concentraciones de 20 a 40  $\mu$ g de proteína de cada fracción, por 20 g de ratón (Possani *et al.* 1981 a).

La primera toxina de *C. noxius* totalmente secuenciada automáticamente fue llamada noxiustoxina (NTX). Esta toxina resultó ser la primer toxina de alacrán reportada contra canales de potasio. Está compuesta por 39 residuos y tres puentes disulfuro. La NTX es un componente de la fracción F.II.11 y presenta una actividad tóxica en dosis de 400 µg por 20 g de ratón (Possani *et al.* 1982).

Existen otras tres toxinas del veneno de *C. noxius*, caracterizadas bioquímica y funcionalmente, que bloquean canales de potasio. La Noxiustoxina 2 (NTX2), eluye en la fracción F.II.11b y posee 38 residuos de aminoácidos con tres puentes disulfuro. Esta toxina registra un 61% de identidad con NTX pero no es tóxica a ratones ni crustáceos. Sin embargo muestra una elevada afinidad hacia canales de insectos (Nieto *et al.* 1996). Las dos últimas fueron denominadas cobatoxina 1 y 2, entre ellas muestran un 84.4% de identidad y la cobatoxina 1 tiene un 33.3% de identidad con la NTX (Selisko *et al.* 1998 b).

Las toxinas contra canales de sodio del veneno de *C. noxius* se nombraron usando las iniciales del género y especie del alacrán seguido por un número. Este número está relacionado con la secuencia cronológica como fueron reportadas en la literatura.

La Cn1 fue el primer péptido tóxico dirigido hacia canales de sodio del veneno de *C. noxius* del que se resolvió su estructura primaria. Purificada de la fracción F.II.14, la Cn1 es una β toxina de 66 aminoácidos con 4 puentes disulfuro y se encuentra en una proporción de alrededor del 2% del veneno total soluble (Possani *et al.* 1985).

Una de las toxinas que se encuentran en mayor cantidad y que muestran un potente efecto tóxico es la Cn2. Esta toxina fue aislada en la fracción F.II.9.2.2, se encuentra en un porcentaje de alrededor del 6.8% del veneno total y es la mejor conocida del veneno de *C. noxius*. La DL<sub>50</sub> de la Cn2 por vía intraperitoneal es de 0.25 µg / 20 g de ratón (Zamudio *et al.* 1992).

En la Cn2 se han enfocado varios estudios bioquímicos e inmunológicos, pues esta toxina se tomó como modelo para realizar comparaciones estructurales con otras, tanto del mismo alacrán como de otras especies. Se ha logrado modelar su estructura tridimensional (Gurrola *et al.* 1994), y también han reportado la secuencia nucleotídica de cDNA responsable de la síntesis de la Cn2 (Vázquez *et al.* 1995). La solución de su estructura molecular por resonancia magnética nuclear (NMR) fue resuelta recientemente (Pintar *et al.* 1998).

La tercer toxina de *C. noxius* que actúa sobre canales de sodio fue nombrada Cn3. Tiene un alto porcentaje de homología con Cn2 pues la secuencia lineal reporta un 79% de identidad. Esta toxina se aisló de la fracción F.II.9.2.3. La Cn3 tiene una DL<sub>50</sub> de 0.64 µg / 20 g de ratón por vía intraperitoneal (Zamudio *et al.* 1992).

La toxina Cn4 es un péptido aislado de la fracción F.II.10. Esta compuesta por 66 aminoácidos con cuatro puentes disulfuro y presenta un porcentaje de identidad del 83% con la Cn2 (Vázquez *et al.* 1993). Esta fue la primer toxina que se demostró su acción sobre canales de sodio (Carbone *et al.* 1982), bajo el nombre de toxina II-10.

Una de las toxinas con mayor actividad contra artrópodos y más específicamente hacia crustáceos es la Cn5. Esta toxina se ubica dentro de la fracción Cn F.II.5 y está compuesta por 66 residuos de aminoácidos con cuatro puentes disulfuro (García *et al.* 1997). La secuencia nucleotídica que codifica para la toxina también ha sido resuelta (Becerril *et al.* 1993).

Las demás toxinas reportadas de *C. noxius* dirigidas hacia canales de sodio de mamíferos fueron aisladas de las fracciones F.II.12.3, F.II.13.3, F.II.13.4 y F.II.14.4; se denominaron Cn6, Cn7, Cn8 y Cn9 respectivamente. Todos estos péptidos tienen una elevada homología con la Cn2. En particular Cn7 presenta una alta afinidad hacia canales de sodio. En ensayos de desplazamiento en membranas de cerebro de rata la Cn7 desplaza a la toxina γ de *Tytilus serrulatus*, (una potente toxina de tipo β), a tal

grado que se ha afirmado que la Cn7 es la toxina de mayor afinidad a canales de sodio de mamíferos del veneno de *C. noxius* (Valdivia *et al.* 1994).

La última toxina del tipo  $\beta$  encontrada en el veneno de *C. noxius*, fue la llamada Cn10. Esta muestra gran toxicidad en artrópodos. La Cn10 se encuentra ubicada en la fracción F.II.5 del veneno de *C. noxius*. Esta toxina se modeló tridimensionalmente y comparada con una secuencia consenso de toxinas contra mamíferos, tiene un 53% de similaridad y un 80% en comparación con la secuencia consenso de toxinas contra artrópodos (Selisko *et al.* 1996).

Dentro de las toxinas de sodio es importante hacer notar que la Cn5 y Cn10 fueron examinadas en retos de toxicidad en ratones presentando una muy baja capacidad tóxica, a pesar de tener un elevado porcentaje de similitud con la toxina Cn2 (tabla 1.). Aunado a esto, la Cn10 presentan un desplazamiento de la toxina Cn2 en ensayos de pegado a canales de cerebro de rata. Ambas toxinas fueron purificadas de la fracción F.II.5. (Selisko *et al.* 1996, García *et al.* 1997). Por lo anterior, la F.II.5 se constituye como un antígeno interesante para evaluar su capacidad inductora de una respuesta inmune cuyos anticuerpos podrían potencialmente reconocer de manera cruzada, en función de la homología estructural tanto de la Cn5 y la Cn10 con la Cn2, los péptidos tóxicos para mamíferos como la misma Cn2 y por tanto inducir protección y neutralización de los efectos tóxicos de Cn2 y del veneno total de *C. noxius*.

En la tabla 1. se muestra los nombres y las secuencia totales o parciales de las toxinas hasta ahora descritas del veneno de *C. noxius*; además se indica el tipo de canal al cual afecta, que fracción del veneno contiene dichos péptidos y en que organismos presenta mayor toxicidad

### **Inmunogenicidad de las toxinas de alacrán.**

Los primeros trabajos sobre la inmunogenicidad de los venenos de alacrán se enfocaron en la generación de una respuesta inmune mediante el uso de las toxinas

Tabla 1. Toxinas aisladas y purificadas del veneno soluble de *C. novius* ordenadas de acuerdo al tipo de canal sobre el cual actúan y el tipo de organismo al que presentan mayor afinidad. Se muestra la fracción donde se ubica cada una de las secuencias de aminoácidos y el porcentaje de similitud a las toxinas más importantes del veneno para canales de potasio o de sodio

Nombre	Purificada de la Fracción	Toxinas contra canales de potasio	Porcentaje de similitud a NTX
NTX	F II.11a	TIINV KCTSP KQCSK PCKEL YGSSA GAKCM NGKCK CYNN	100
NTX2	F II.11b	TIINV EKCEFA TSQCW TPCKK AIGSL QSKCM NGKCK CYNG	61
Cobatoxina 1	F II. 14	AVCVY RTCDK DCKRR GYRSG KCINN ACKCY PY	33.3
Cobatoxina 2	F II.11	VACVY RTCDK DCTSR KYRSG KCINN ACKCY PY	36.5
<b>Toxinas contra canales de sodio de mamíferos</b>			<b>Porcentaje de similitud a Cn2</b>
Cn1	F II.14	KDGYL VDAKG CKFNC YKLGK NDYCN RECRM KHRGG SYGGY CYGFG CYCEG LSDST PTWPL TNKTC	53.8
Cn2	F II 9 2.2	KEGYL YDKNT GCZYE CLKLG DNDYC LRECK QQYVK GAGGY CYAFA CWCTH LYEQA IVWPL PNKRC S	100
Cn3	F II.9.2.3	KEGYL VELGT GCKYE CFKLG DNDYC LRECK ARYVK GAGGY CYAFG CWCTQ LEQAV VWPLK NKTCR	78
Cn4	F II.10	KEGYL VNSYT GCKYE CFKLG DNDYC LRECK NNYVK GAGGY CYAFG CWCTT HLYEQAVVWPLKNKTCN	84.6
Cn6	F.II.12.3	n.d.	n.d.
Cn7	F II.13.3	KEGYL VNYHD GCKYE CYKLG DNDYC LRECK LRVVK GAGGY CYAFA CWCTH LYEQA	81.1
Cn8	F II.13.4	KEGYL VNYYT GCKFA CAKLG DNDYC LRECK ARYVK GAGGY CYAFG CWCTHL YEQAV VWPLP K	80.3
Cn9	F.II.14.4	KKGGY PIQEN GCKY	57.1
<b>Toxinas con alta toxicidad hacia artrópodos</b>			
Cn5	F II 5	KEGYL VNKST GCKYK CLLLG KNEGC DKECK KNQGG SYGYC VAFGC WCEGL PESTP PTYPL PNKSC S	58.2
Cn10	F II 5	KEGYL VNKST GCKYN CLLLG ENKNC DMECK CKNQG SYGYC YKLAC WCEGLPESTPTYPIGKTCRTE	51.5

más importantes del veneno en lo referente a la proporción en el mismo o su toxicidad.

Se realizaron ensayos utilizando como antígenos las fracciones tóxicas del veneno de *C. noxius* detoxificadas mediante polimerización con glutaraldehído. Los anticuerpos obtenidos fueron capaces de neutralizar los efectos de veneno y proteger, tanto en reto directo a ratones como con el uso del suero incubado con la fracción F.II del veneno hasta 50 DL<sub>50</sub>. Además estos anticuerpos mostraron reacción cruzada a venenos de alacranes del Género *Centruroides sp.* y también sobre el veneno de *T. serrulatus* (Possani *et al.* 1981 b). Efectos similares de inmunización con péptidos detoxificados y protección a venenos completos de alacranes venenosos han sido reportados para otras especies de alacranes como *Androctonus australis* Hector y *Butuhus occitanus tunetanus* (Kharrat *et al.* 1996 a).

El uso de péptidos sintéticos que correspondieran a fragmentos de las toxinas más potentes del veneno podría ser un antígeno lógico, que no produjera los efectos tóxicos al ser inyectados en los animales y que a su vez estimulara la producción de anticuerpos capaces de bloquear la actividad de la toxina. Los segmentos amino terminales de entre los 10 a los 27 primeros residuos aminoácidos eran capaces de producir sueros neutralizantes ante la toxina Cn2, pero el reto directo a ratones previamente inmunizados con estos péptidos sintéticos generaban reacciones de sensibilización (Calderón-Aranda *et al.* 1995). En este sentido se ha propuesto que la sensibilización de los ratones inmunizados con péptidos sintéticos distintos a los antígenos nativos puede estar relacionada con la forma como el antígeno es presentado a los linfocitos T; además estas características pueden variar dependiendo de las cepas de animales utilizadas en la inmunización (Dolimbek y Atassi 1996).

Otros trabajos se enfocaron en definir las secuencias más conservadas de las toxinas y a partir de ellas elaborar péptidos sintéticos, valorando cuáles de éstos eran capaces de producir anticuerpos neutralizantes de las toxinas más potentes. Los resultados obtenidos indicaban que la fracción amino terminal de las toxinas está fuertemente involucrada con los procesos de neutralización de las toxinas completas

(Granier *et al.* 1989). El trabajo fue realizado utilizando los anticuerpos generados contra la toxina AaH II procedente del alacrán *A. australis* Hector. Los péptidos sintetizados a partir de la secuencia amino terminal de AaH II mostraban su capacidad de inducir protección en conejos inmunizados sometidos a reto directo, así como neutralización cuando fue usado el suero inmune (Devaux *et al.* 1996)

También se ha reportado que se induce neutralización y protección ante el veneno de *A. australis* Hector utilizando sueros inmunes contra la secuencia total de la toxina AaH II, obtenidos por síntesis química en fase sólida, sustituyendo los residuos de cisteína por ácido  $\alpha$ -aminobutírico. Dicho péptido no presenta toxicidad en mamíferos, mientras que los animales inmunizados con él mostraron protección, hasta por seis meses, haciendo retos con dosis de 8 veces la  $DI_{50}$  (Zenouaki *et al.* 1997).

Por otro lado, la generación de anticuerpos monoclonales hacia toxinas constituye como una importante herramienta para el tratamiento de envenenamiento (Isaacs *et al.* 1996). Sin embargo la obtención de anticuerpos monoclonales contra toxinas específicas del veneno de alacranes se complica debido a sus efectos tóxicos. El uso de conjugados o acarreadores de toxinas como  $\gamma$ -globulina ha permitido la obtención de algunos anticuerpos monoclonales (Zamudio *et al.* 1992). De esta forma se aisló el BCF2, un anticuerpo capaz de neutralizar 32  $DI_{50}$  de Cn2 con un miligramo de anticuerpo purificado y 28  $DI_{50}$  del veneno soluble de *C. noxius* (Licea, *et al.* 1996). También se ha reportado que el suero anti Cn2 es capaz de reconocer otras toxinas que pertenecen a distintas subespecies de alacranes como *C. limpidus limpidus*, *C. limpidus acatlanensis*, *C. limpidus tecomanus* (Calderón-Aranda *et al.* 1993). El 23C6 es otro anticuerpo monoclonal inducido por la inmunización de péptidos sintéticos no tóxicos similares a la toxina AaH II (Zenouaki *et al.* 1997), un miligramo de IgG neutraliza 200  $DI_{50}$  de AaH II (Devaux *et al.* 1997).

También se han utilizado como antígenos fracciones no tóxicas a mamíferos presentes en el veneno de distintos alacranes para obtener anticuerpos neutralizantes. En este sentido la proteína llamada TsNTxP es un péptido no tóxico en ratones y fue

purificado del veneno del alacrán *T. serrulatus* (Chávez-Olórtegui *et al.* 1996), fue utilizado para la inmunización de ratones, reportando protección *in vivo*, durante 130 días, ante el reto con 10 DL<sub>50</sub> de veneno total de *T. serrulatus* (Moreira-Ferreira *et al.* 1998). De hecho ha sido reportado que los anticuerpos generados por la TsNTxP son capaces de neutralizar el veneno soluble de *T. serrulatus* (un mililitro de suero de conejo es capaz de bloquear la acción de 20 DL<sub>50</sub>) y muestra una ligera reacción cruzada con los venenos de otras especies del Género (Chávez-Olórtegui *et al.* 1997).

Por último, las toxinas recombinantes que muestran efectos tóxicos sobre insectos se han empleado para levantar una respuesta inmune protectora y neutralizante en mamíferos. La toxina Bot XIV del veneno del alacrán *B. occitanus tunetanus* muestra alta toxicidad hacia insectos y en ensayo en ratones por vía intracerebroventricular no muestra toxicidad. Los anticuerpos obtenidos mediante la inmunización con la toxina recombinante unida con dos proteínas de fusión induce protección en ratones hacia los componentes altamente tóxicos de este veneno; 150 µl de suero inmune neutraliza 60 DL<sub>50</sub> con un 83% de sobrevida y muestra neutralización del 100% del veneno en dosis 40 DL<sub>50</sub> (Bouhaouala-Zahar *et al.* 1996).

Todos los trabajos arriba mencionados han aportado en diferente medida datos importantes para la búsqueda, elaboración y uso de péptidos no tóxicos con similitud a las toxinas más importantes de los venenos de alacranes peligrosos. El uso de estos péptidos en la generación de antisueros neutralizantes o con capacidad protectora ante venenos de alacranes es el fin principal de las investigaciones inmunológicas de las toxinas de alacranes.

Como anteriormente se menciona el emplear toxinas en la inducción de una respuesta inmune presenta dificultades pues es necesario eliminar sus efectos dañinos. Si se desea utilizarlos en humanos, como posibles vacunas, es necesario comprobar que los antígenos usados sean completamente inofensivos para el individuo, que la respuesta inmune generada por éste sea eficiente en la neutralización del veneno y que además se mantenga por tiempos razonables. El uso de péptidos con baja toxicidad a mamíferos o la

síntesis de fragmentos no tóxicos de las principales toxinas del veneno han dando mejores resultados; aunque se han reportado también fenómenos de sensibilización al veneno o la toxina usada como antígeno.

La intención de esta tesis se encamina al estudio inmunológico de una fracción del veneno de *C. noxius* (la Cn F.II.5) para evaluar su capacidad de generar anticuerpos que muestren reacción cruzada, neutralización y protección contra Cn2 y el veneno total del este alacrán. Como previamente se mencionó en este trabajo la peculiaridad mostrada por la Cn F.II.5 al contener toxinas con baja toxicidad en mamíferos y alta similitud a Cn2. Con este fin se han planteado los siguientes objetivos.

## OBJETIVOS

### Objetivo General.

Estudiar la capacidad inmunogénica de la fracción Cn F.II.5 y evaluar la capacidad protectora y neutralizante de suero anti Cn F.II.5 contra la toxina Cn2 y el veneno total de *C. noxius*.

### Objetivos específicos.

- 1) Purificar la Cn F.II.5 por cromatografía de exclusión molecular e intercambio iónico.
- 2) Obtener las secuencias de aminoácidos de los componentes de la Cn F.II.5 purificados por CLAR.
- 3) Determinar la toxicidad de la Cn F.II.5 hacia mamíferos y crustáceos.
- 4) Evaluar la capacidad inmunogénica de la Cn F.II.5 en ratones y conejos.
- 5) Evaluar la capacidad protectora *in vivo*, contra el veneno total y la toxina Cn2 en ratones, de los anticuerpos anti Cn F.II.5 inducidos en ratón.
- 6) Evaluar la capacidad neutralizante *in vitro* contra la Cn2 del suero inmune de conejo inducido con la fracción Cn F.II.5

## **Material y Métodos.**

Todos los reactivos químicos utilizados en este trabajo fueron de pureza grado analítico y obtenidos en las compañías enlistadas en las publicaciones anteriores del laboratorio. (Calderón-Aranda et al. 1998, Calderón-Aranada et al. 1995, Zamudio et al. 1992, Selisko et al. 1996, Vázquez et al. 1995).

### **Obtención del veneno.**

El veneno del alacrán *C. noxius* se obtuvo en el laboratorio mediante estimulación eléctrica del telson de alacranes vivos y fue almacenado en congelación a -20 °C. Posteriormente se recuperó en agua tetradestilada y se centrifugó durante 10 minutos. El veneno soluble fue resuspendido, liofilizado y almacenado nuevamente a -20 °C hasta su uso.

### **Purificación de la fracción Cn F.II.5.**

Se separó el veneno soluble mediante una cromatografía de exclusión molecular en una columna (170 x 2.5 cm) con Sephadex G-50 medio, usando una solución de acetato de amonio 20 mM pH 4.7 como amortiguador y un flujo de 12 ml por hora. De este modo se obtuvieron cuatro fracciones en base a las diferencias de peso molecular. La fracción II fue procesada mediante una segunda cromatografía de intercambio iónico en una columna (27 x 0.9 cm), usando resina de Carboximetilcelulosa 32, y como eluyente se utilizó un amortiguador de acetato de amonio 20 mM pH 4.7 con un gradiente salino de 0 a 0.5 M. En este proceso fueron obtenidas 14 fracciones de entre las cuales se encuentra la Cn F.II.5.

### **Cuantificación de la proteína en solución.**

El contenido de proteína en solución fue estimado mediante la lectura de la

densidad óptica a 280 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Beckman DU-50, asumiendo que cada unidad es igual a un miligramo de proteína por mililitro de solución, en una cubeta de 1 cm de paso óptico.

### **Diálisis de la fracción Cn F.II.5.**

La fracción Cn F.II.5 fue sometida a diálisis haciendo cuatro cambios de un litro de agua bidestilada cada 15 minutos usando membranas de diálisis marca Spectra/Por 3 Molecular Weight Cut off 3,500, con el fin de eliminar las sales presentes en la fracción.

### **Purificación de las subfracciones de la Fracción Cn F.II.5.**

La purificación de la fracción Cn F.II.5 se realizó por cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), usando como amortiguador A (ácido trifluoroacético al 0.12 % en agua tetradestilada) y como amortiguador B (ácido trifluoroacético al 0.1% en acetonitrilo). Se inyectó la fracción Cn F.II.5 en una columna C<sub>4</sub> semipreparativa de fase reversa y se utilizó un programa con un gradiente lineal de 0 a 60% de amortiguador B en 60 minutos, con un flujo constante de bombeo de 2 ml / min, utilizando un equipo de CLAR Waters modelo 600E con detector de longitud variable uv/visible.

Cada uno de los componentes obtenidos de la cromatografía por CLAR en la columna C<sub>4</sub> semipreparativa fue nuevamente purificados en una columna C<sub>18</sub> analítica de fase reversa con un programa idéntico de 0 a 60% de amortiguador B en 60 minutos y un flujo constante de bombeo de 1 ml / min. El componente más abundante de cada repurificación fue seleccionado y cuantificado el contenido de proteína en solución acuosa. Cada uno de estos componentes fueron desecados en vacío y almacenados a 20°C hasta su uso.

### **Secuenciación de los péptidos.**

Se usaron al menos 15 µg de cada componente purificado de la Fracción Cn F.II.5 para realizar la secuencia de aminoácidos usando la técnica de Edman, en un

secuenciador automático Millipore/Biosearch modelo 6400/6600. La muestra se resuspendió en agua tetradestilada 15 µl y se aplicó en una membrana CD inmovilizada (Millipore); se operó el secuenciador para la obtención de 25 ciclos y cuando la muestra lo permitió se repitió el programa con el fin de identificar el mayor número posible de residuos.

### **Inmunización.**

Los animales utilizados en la inmunización, en los retos de toxicidad y neutralización fueron producidos y mantenidos en condiciones óptimas, (agua, alimento especial para animales de laboratorio y aserrín esterilizados; los ratones se manejaron en cajas de acrílico conteniendo 6 animales por caja), en el bioterio del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

Para la inmunización se utilizaron 56 ratones hembra *Mus musculus*, de la cepa CDI, de cuatro semanas de edad. El programa de inmunización se puede observar en la tabla 2a, con el objeto de realizar el reto directo una vez terminado el protocolo de inmunización.

Antes de iniciar la inmunización de los ratones se extrajo 100 µl de sangre a cada uno, mediante una pequeña incisión del extremo de la cola; del grupo de 36 ratones se obtuvieron cerca de 3.5 ml de sangre de los cuales se separó el suero para ser usado como control. Cada uno de los dos sangrados hiperinmunes fueron realizados de la misma forma.

Se utilizó también un conejo hembra *Sylvilagus floridanus*. Nueva Zelanda de 2.5 kg de peso y se desarrolló un programa de inmunización muy similar (tabla 2b) destinado a la obtención de suero anti Cn F. 11.5 de conejo para realizar el reto indirecto.

El suero preinmune de conejo fue obtenido mediante el sangrado de 5 ml de la oreja del animal. El segundo sangrado, posterior a la segunda inmunización, también fue de 5 ml. En el último sangrado, posterior a la cuarta inmunización, se extrajo el volumen

- a) Día 1. Sangrado preinmune.\*  
 Inmunización del grupo control con una emulsión de ACF+PBS.\*\*  
 Inmunización del grupo experimental con una emulsión de 1.44 µg de Cn F.II.5+ACF+PBS / ratón.\*\*
- Día 15. Reinmunización del grupo control con una emulsión de AIF+PBS.\*\*  
 Reinmunización del grupo experimental con una emulsión de 0.55 µg de Cn F.II.5+AIF+PBS / ratón.\*\*
- Día 30. Reinmunización del grupo control con una emulsión de AIF+PBS.\*\*  
 Reinmunización del grupo experimental con una emulsión de 0.55 µg de Cn F.II.5+AIF+PBS / ratón.\*\*
- Día 39. Primer sangrado hiperinmune.\*
- Día 54. Reinmunización del grupo control con una emulsión de AIF+PBS.\*\*  
 Reinmunización del grupo experimental con una emulsión de 0.55 µg de Cn F.II.5+AIF+PBS / ratón.\*\*
- Día 69. Reinmunización del grupo control con una emulsión de AIF+PBS.\*\*  
 Reinmunización del grupo experimental con una emulsión de 0.55 µg de Cn F.II.5+AIF+PBS / ratón.\*\*
- Día 78. Segundo sangrado hiperinmune\*.
- Día 94. Reto directo con DL<sub>50</sub> de veneno total *C.noxius* y Cn2.
- b) Día 1. Sangrado preinmune.\*\*\*  
 Inmunización con 200 µg de Cn F.II.5+ACF+PBS.
- Día 15. Reinmunización con 100 µg de Cn F.II.5+AIF+PBS.
- Día 30. Reinmunización con 100 µg de Cn F.II.5+AIF+PBS.
- Día 39. Primer sangrado hiperinmune.\*\*\*
- Día 54. Reinmunización con 100 µg de Cn F.II.5+AIF+PBS.
- Día 69. Reinmunización con 100 µg de Cn F.II.5+AIF+PBS.
- Día 78. Segundo sangrado hiperinmune.\*\*\*\*

ACF (adjuvante completo de Freund); PBS (buffer salino de fosfatos); AIF (adjuvante incompleto de Freund); \*(alrededor de 1 ml por animal); \*\*(cada ratón fue inmunizado con 100 µl de emulsión); \*\*\* (5 ml); \*\*\*\*(sangrado a blanco).

total de sangre del conejo (sangrado a blanco).

Se utilizaron veinte ratones como grupo control, inmunizados con 100 µl de una emulsión de adyuvante completo de Freund (ACF) y amortiguador salino de fosfatos (PBS) en proporción 1:1 (v/v) por vía subcutánea; con cuatro reinmunizaciones subsecuentes con adyuvante incompleto de Freund (AIF) y PBS con proporción 1:1 (v/v). Para la inmunización de 35 ratones con la fracción Cn F.II.5, ésta se resuspendió en agua bidestilada. En la primera inmunización se hizo una emulsión que contenía: 1.44 µg de la fracción Cn F.II.5 por ratón, ACF y PBS en relación 1:1 (v/v). Cada ratón fue inyectado con 100 µl de esta emulsión por vía subcutánea. En las siguientes reinmunizaciones se inyectaron 100 µl de emulsión, (0.55 µg de la fracción por ratón, AIF y PBS 1:1 (v/v)).

En el conejo se usaron en la primera inmunización 200 µg de Cn F.II.5, 500 µl de ACF y el resto en PBS para obtener 1 ml de volumen. Para las posteriores reinmunizaciones se utilizó 100 µg de la fracción, 500 µl de AIF y PBS hasta obtener 1 ml de volumen total. Se emulsificó la mezcla y se administró por vía subcutánea.

#### **Evaluación de la toxicidad de la fracción Cn F.II.5 .**

La toxicidad de la fracción Cn F.II.5 contra mamíferos se realizó en ratones de la cepa CDI, de entre 20 y 25 g de peso; inyectando por vía intraperitoneal diferentes cantidades de proteína total de la fracción Cn F.II.5. (entre 50 y 500 µg), ajustadas a un volumen final de 200 µl de PBS. Los ratones inyectados fueron mantenidos en observación durante las siguientes 24 horas, evaluando la toxicidad de la dosis al presentar los síntomas característicos (excitabilidad, irritabilidad, piloerección, sialorrea, contracción muscular, etc.) o la letalidad de la misma finalizar este tiempo.

La toxicidad en crustáceos se realizaron en cochinillas *Armadiillum vulgare*. Se utilizaron dosis de 2.5 a 7 µg de la fracción total Cn F.II.5 por cada 100 mg de peso, con volumen final de 5 µl de agua bidestilada, aplicando la microinyección en el último segmento del cuerpo por la región ventral. Una vez inyectadas las cochinillas se mantuvieron en observación por 24 horas y se registró la toxicidad (parálisis flácida o espásmica, discordancia motora al mostrar movimientos circulares y lentos) o letalidad de la dosis al culminar el tiempo.

#### **Evaluación de la capacidad protectora y neutralizante de los anticuerpos anti Cn F.II.5.**

##### **Reto directo ( protección *in vivo*).**

Se retaron tanto los ratones inmunizados con la fracción Cn F.II.5 como los

inmunizados con adyuvante de Freund (control) administrando una  $DL_{50}$  del veneno, total (5  $\mu\text{g}/20$  g ratón) o una  $DL_{50}$  de Cn2 (0.25  $\mu\text{g}/20$  g de ratón), por vía intraperitoneal, evaluando la sobrevida de los grupos 24 horas después de la administración del veneno.

### **Reto en terceros (neutralización *in vitro*).**

Para ello se mezclaron distintas cantidades de suero de conejo anti Cn F.II.5 (50, 100, y 200  $\mu\text{l}$ ), con una ó 1.5  $DL_{50}$  de Cn2 por espacio de una hora en agitación constante a temperatura ambiente. Posteriormente las mezclas, con un volumen final de 200  $\mu\text{l}$ , fueron administradas en ratones CD1 por vía intraperitoneal, evaluando la sobrevida a las 24 horas.

### **Titulación y reactividad cruzada de sueros anti Cn F.II.5.**

La titulación de anticuerpos de los sueros anti Cn F.II.5 y la reactividad cruzada, se realizaron mediante ensayo inmunológico ligado a enzima (ELISA), usando placas de vinil (Costar). Las pruebas de titulación de anticuerpos se realizaron por duplicado pegando a los pozos 50  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía: amortiguador de carbonatos de sodio 0.1 M pH 9.5, la fracción Cn F.II.5, la Cn2 o el veneno total de *C. noxius* en concentraciones 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , durante 2 hr a temperatura ambiente. Posteriormente los pozos fueron bloqueados con una solución de PBS y BSA al 3% (v/v) durante 1 hr a 36 °C y se agregaron los sueros anti Cn F.II.5 y el suero preinmune tanto de conejo como murino en diluciones dobles seriadas utilizando un amortiguador de PBS BSA 3% y PBS Tween 20 al 1% en proporción 1:1 (v/v) por 1 hr a 36 °C. El segundo anticuerpo utilizado fue anticuerpo de cabra anti IgG, de conejo o de ratón según el caso, conjugado con la enzima peroxidasa, se uso en dilución 1/3000 con el amortiguador antes mencionado durante 2 hr a 36°C. El revelado se efectuó añadiendo orto-fenil-diamina 5 mg/ml y  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.4  $\mu\text{l}/\text{ml}$  como sustrato en amortiguador de fosfatos 5 mM pH 7.3 y deteniendo la reacción con HCl 6 N cuando el control positivo coloreaba adecuadamente. Posteriormente al revelado se efectuó la lectura de la densidad óptica a 492 nm de

longitud de onda en un espectrofotómetro marca BIO-RAD modelo 2550 EIA Reader.

Entre cada paso. las placas fueron lavadas con solución de lavado de PBS- Tween 20 1% en seis ocasiones.

Los ensayos de reactividad cruzada del anticuerpo monoclonal BCF2 y del suero hiperinmune anti Cn F.II.5 de conejo se realizaron uniendo cada uno de los componentes purificados de la fracción de la Cn F.II.5 y la Cn2 (3  $\mu\text{g/ml}$ ), agregando 50  $\mu\text{l}$  por pozo, se saturó la placa con BSA 3% (v/v) y se agregó el anticuerpo monoclonal o el antisuero contra la fracción en concentraciones de 12  $\mu\text{g/ml}$  y 1:100 (v/v) respectivamente, se reveló nuevamente con anticuerpos de cabra anti IgG ligado a la enzima peroxidasa en dilución 1/3000 y se reveló con orto-fenil-diamina y  $\text{H}_2\text{O}_2$  como sustrato. Los amortiguadores así como el lavado y la lectura fueron realizados las mismas especificaciones arriba mencionadas.

## Resultados.

Los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser divididos en dos partes: una primera referente a la purificación y obtención de las secuencias parciales de los componentes de la fracción Cn F.II.5 y la segunda enfocada a la caracterización inmunogénica de ésta.

### A. Separación y Caracterización Química.

Dentro de la parte bioquímica se logró separar eficientemente la fracción Cn F.II.5 mediante dos pasos cromatográficos consecutivos; El primer paso se basa en las diferencias de masa molecular entre los distintos componentes del veneno; obteniendo cuatro fracciones bien definidas: F.I, F.II, F.III y F.IV; de éstas la F.II contiene el 80 % del veneno total, la fracción F.III representa el 10.8 %, la F.IV el 7.5 % y la F.I con sólo el 5% de proteína que constituye la fracción minoritaria (Fig. 4).

Con la fracción F.II, tóxica a ratones, se procedió a realizar una nueva cromatografía basada en las diferencias de la carga neta de cada una de las toxinas presentes en la fracción, usando una resina capaz de retener las partículas cargadas (Fig. 5). Después de cargar la F.II en la columna se eliminan los elementos que no se unieron a la resina dejando correr 10 ml de amortiguador y posteriormente se inició un gradiente lineal de NaCl de 0 a 0.5 M, lo que permitió la salida paulatina de las distintas fracciones de acuerdo a la magnitud de sus cargas. El resultado de esta cromatografía de intercambio iónico muestra 14 subfracciones, F.II.1 a F.II.14.

La Cn F.II.5 constituye el 14.3% de la proteína total de la fracción F.II, sólo abajo de las fracciones F.II.9 con el 24% y la F.II.8 que representa el 15.7%; la fracción F.II.6 representa al 9.1%, la F.II.4 tiene un 6.9% y la F.II.1 registra 4.7%, mientras que el resto de las fracciones representaron porcentajes menores al 4% del total de la proteína aplicada

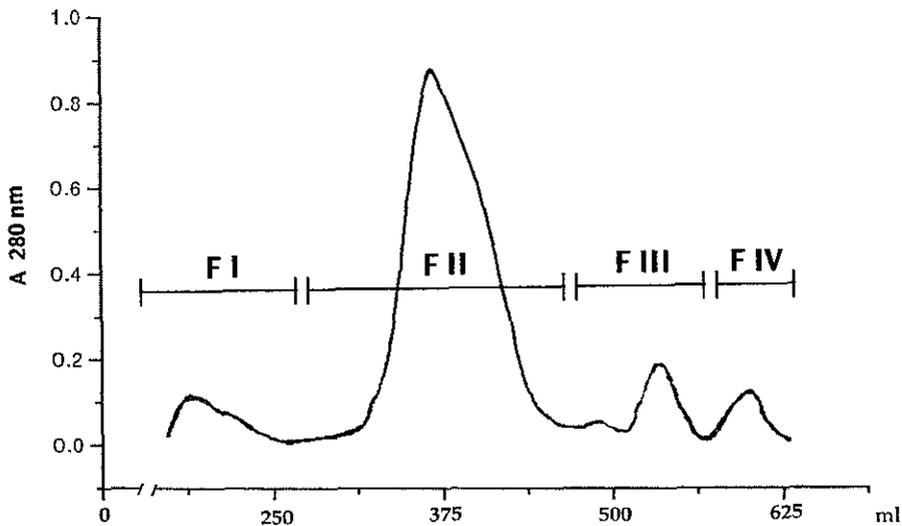


Fig 4. Cromatografía del veneno soluble de *C. noxius*. En una columna de 2.5 x 170 cm de Sephadex G-50, medio, equilibrada con 0.02 M de acetato de amonio, pH 4.7 fue cargada con 6.3 ml de veneno soluble conteniendo 500 mg de proteína leída a 280 nm y eluido con el mismo amortiguador con un flujo de 50 ml/hr. se colectaron por separado alicotas de 2.5 ml.

La fracción Cn F.II.5 fue separada y dializada con el objeto de eliminar las sales que eluyen de la columna de intercambio iónico junto con las fracciones proteicas. Una vez eliminados los residuos salinos, la fracción Cn F.II.5 fue liofilizada y almacenada a 20 °C hasta su uso.

La separación de los componentes de la Cn F.II.5 se realizó por CLAR. En esta nueva etapa se inyectó 1 mg de la fracción Cn F.II.5 en 170 µl usando una columna semipreparativa de alta presión C<sub>4</sub>, a un flujo constante de 2 ml por minuto. La figura 6 muestra el cromatograma obtenido de una corrida de la Cn F.II.5, leída a 230 nm de longitud, y usando un programa lineal de 0 a 60% de amortiguador B en una columna C<sub>4</sub> de fase reversa.

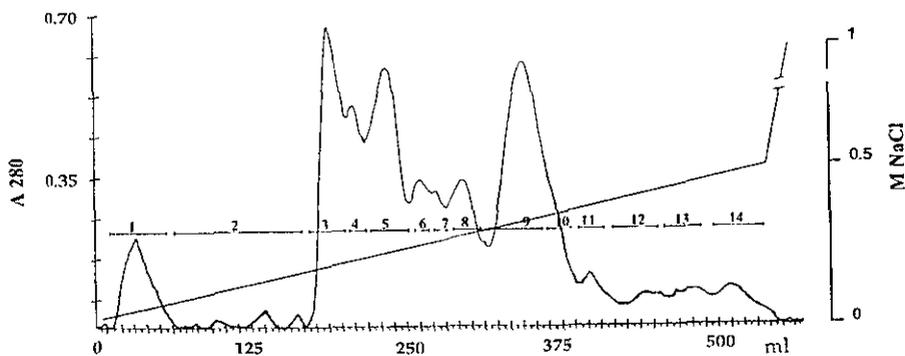


Fig 5 Cromatografía de intercambio iónico la fracción II del veneno de *C. novius*. Una columna de carboximetil-celulosa 32 (0.9 x 27cm) equilibrada con 0.02 M de acetato de amonio, pH 4.7 fue cargada con 95 mg de la fracción en peso seco, en 17 ml de solución. Se aplicó un gradiente lineal con 240 ml de amortiguador de acetato de amonio que contenía 0.5 M de NaCl, iniciando a los 10 ml de elución y al final del gradiente la columna se lavó con una solución 1M de NaCl en amortiguador de acetato de amonio. Las fracciones fueron colectadas en alíquotas de 2.5 ml por separado con un flujo constante de 30ml/hr. Cada uno de los números corresponden al número de fracción recuperada por separado.

Se pueden distinguir 24 componentes distintos que fueron colectados por separado. Cada uno de estos fue denominado en base a los números utilizados previamente para los péptidos principales de la fracción. Por ejemplo, la Cn5 en la fracción corresponde al número 21 y a la Cn10 le corresponde el número 19. Los componentes minoritarios (péptidos presentes en menos del 3.5% del total de la fracción) fueron denominados con el número del péptido mayor inmediato anterior seguido por un punto y una nueva numeración, así por ejemplo entre los componentes mayoritarios 20 y Cn5 hay dos componentes menores denominados 20.1 y 20.2.

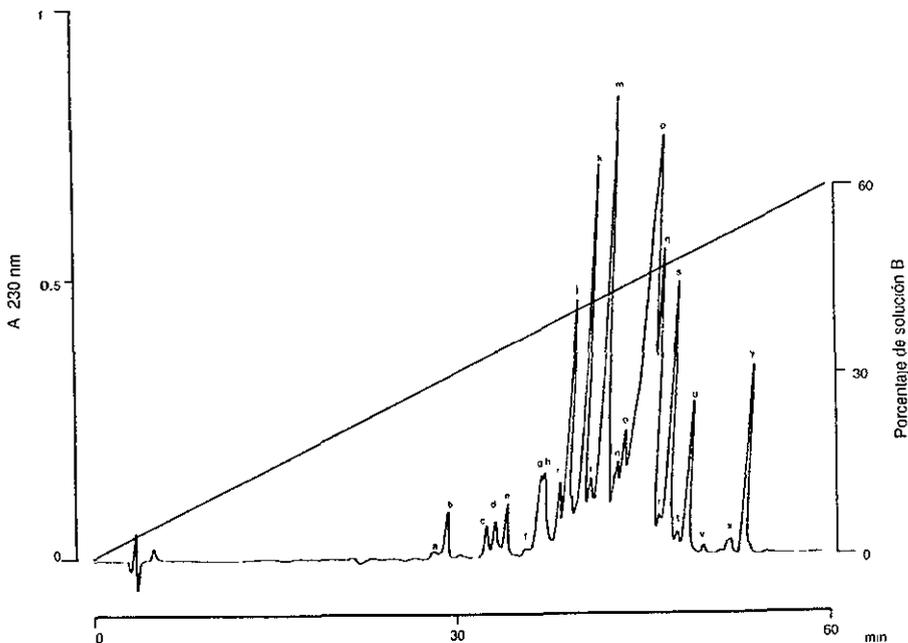


Fig. 6 Cromatografía por HPLC de la fracción II.5 del veneno de *C. noxius*. Una columna  $C_4$  semipreparativa de fase reversa. Se aplicó 1mg de la fracción leída por absorbancia a 280 nm en 170  $\mu$ l. El cromatograma fue realizado en base a lecturas de 230 nm. a.17.1, b.17.2, c.17.3, d.17.4, e.17.5, f.17.6, g.17.7, h.17.8, i.17.9, j.18, k.Cn10, l.19.1, m.20, n.20.1, o.20.2, p.Cn5, q.22, r.22.1, s.23, t.23.1, u.24, v.24.1, x.24.2, y.25)

Una nueva cromatografía por CLAR se realizó para cada uno de los componentes que se obtuvieron de la Cn F.II.5, utilizando para ello una columna  $C_{18}$  de fase reversa, esto con la finalidad de asegurar la pureza de los componentes. Estos péptidos fueron utilizados para la obtención de la secuencia amino terminal usando el secuenciador automático de aminoácidos, de cada una de las subfracciones que no habían sido secuenciadas anteriormente. En la tabla 3 se muestra la secuencias totales o parciales del extremo amino terminal a carboxilo terminal de cada uno de los 19 componentes de la fracción Cn.F.II.5 que se lograron secuenciar satisfactoriamente. La limitante principal para la secuenciación de los péptidos fue la baja cantidad de proteína pura obtenida.

Tabla 3. Secuencias completas o parciales de los péptidos componentes de la fracción Cn F.II.5 del veneno del alacran *C. novius* del extremo amino terminal al carboxilo terminal

num	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	
17.2	VTINK	XTSPQ	QLSKP	XAAFG	IXAGG	KXING	KXK							
17.4	VFDIK	K												
17.5	TFIDX	DXTPX	KEXDA	PDKA										
17.7	VAGYX	ED												
17.8	VDKLS	EGKGM	STLYG	KSINN										
17.9	DYKLE													
18	KDGYP	LAXNG												
Cn10	KEGYL	VNKST	GCKYN	CLILG	ENKNC	DMECK	AKNQG	GSYGY	CYKLA	CWCEG	LPEST	PTYPI	GKTCR	TK
19.1	KEGYL	VNKNG	GXXYN	XGLGE										
20	ARDGY	PVDEK	GXKL											
20.1	KXDYP													
20.2	KGXKL	SXLIN	DKXGN											
Cn5	KEGYL	VNKST	GCKYG	CLLLG	KNEGC	DKECK	KNQGG	SYGYC	YAFGC	WCEGL	PESTP	PTYPL	PNKSC	S
21.1	KEGYL	VNKXT	GKKYG	XLLLG	GKNQ									
22	KEGYL	VNKST	GLKYG	LLLGX	NQG									
23	KDGYP	LGRTQ	STVPP	XFDN										
24	ARDGY	LVDKE	GXKLF	XYINN	K									
24.2	ARDGY	LVDKE	GXKLF	XVINN										
25	PXDGY	VMTSD	NYSLP	SXYSN	XXNR									

## **B. Ensayos Biológicos.**

Para evaluar la capacidad tóxica y especificidad hacia mamíferos y artrópodos de los péptidos purificados se realizaron ensayos de toxicidad, además de generar anticuerpos policlonales en conejo y ratón para evaluar su capacidad protectora y neutralizante.

Los ensayos de toxicidad en mamíferos mostraron que a partir de la administración de 500 µg por 20 g de ratón de la fracción Cn F.II.5, ésta era letal, pues uno de los cuatro ratones murió y dos de ellos mostraron síntomas de toxicidad (tabla 4a). Como controles fueron utilizados 2 grupos de 4 ratones, de los cuales el primero fue inyectado con 200 µl de PBS y el otro grupo se inyectó con el amortiguador utilizado para la purificación de la Cn F.II.5 (5 ml de acetato de amonio 20 mM). Esta solución fue liofilizada y resuspendida en un mililitro de agua, se tomaron 170 µl de ella y 30 µl de PBS, para comprobar que los residuos generados por el amortiguador después de haber sido liofilizada la fracción no estuvieran involucrados en la toxicidad de la fracción Cn F.II.5; En ambos casos el porcentaje de sobrevida fue del 100% y no se presentaron síntomas de toxicidad.

En crustáceos la cantidad mínima en la cual se observó efectos tóxicos inició a los 3 µg por cada 100 mg de peso de *Armadillum vulgare*, registrándose una sobrevida de 4 cochinillas de un total de 6 inyectadas, esto es un 66.7% de sobrevida, mientras que aplicando 6 y 6.5 µg la sobrevida fue menor (33.7%) y con 7 µg por cada 100 mg de peso se observó 0% de sobrevida (tabla 4.b).

### **Evaluación de la capacidad inmunogénica de la fracción Cn F.II.5.**

La titulación de los sueros, por ELISA, tanto de los ratones como del conejo mostraron una buena repuesta de anticuerpos después de la segunda inmunización (Fig. 7a y de conejo Fig. 7b). El suero de conejo mostró un valor a 492 nm de 0.75

Tabla 4. Toxicidad de la fracción Cn F.II.5 del veneno del alacrán *C. noxius* A) en ratones hembra de la cepa CD1 por vía intraperitoneal B) en cochinillas *Armadillum vulgare* por microinyección en el último segmento del cuerpo

A)

Número de ratones	µg de toxinas / 20g <sup>a</sup> de peso de ratón	Sobrevida <sup>a</sup>	Porcentaje de Sobrevida
2	50	2/2	100
2	100	2/2	100
2	250	2/2	100
4	500	3/4	75
2	200 µl PBS	2/2	100
2	residuos de 5ml de acetato de amonio	2/2	100

B)

Número de <i>A. vulgare</i>	µg de toxinas/100 mgr de peso de <i>A. vulgare</i>	Sobrevida <sup>a</sup>	Porcentaje de sobrevivida
6	0	6/6	100
6	2.5	6/6	100
6	3	4/6	66.7
6	6	2/6	33.3
6	6.5	2/6	33.3
6	7	0/6	0

a. En todos los casos el volumen de aplicación fue de 200 µl ajustado con PBS.

b. La sobre vida fue leída a las 24 horas de la inoculación de los animales

c. El volumen de inoculación final se ajusto a 5 µl.

unidades en diluciones de 1:6400 (v/v) a la fracción Cn F.II.5 y en 0.7 al veneno total de *C. noxius* en diluciones de 1:3200 (v/v). Estos valores representan el 50% del máximo valor de absorbancia obtenido. El suero murino mostro valores de reconocimiento mayores contra la fracción Cn F.II.5 y el veneno total, comparado con el suero de conejo, teniendo lecturas de 1.0 en diluciones de 1:6400 para la fracción Cn F.II.5 y 0.8 unidades en diluciones de 1:3200 al probar con el veneno total de *C. noxius*. La reactividad del suero anti Cn F.II.5 de ratón muestra una baja respuesta hacia la Cn2 al registrar una lectura de sólo 0.25 unidades en diluciones de 1:100 y en suero de conejo los anticuerpos generados presentan un reconocimiento mayor con 0.4 unidades en diluciones de 1:800.

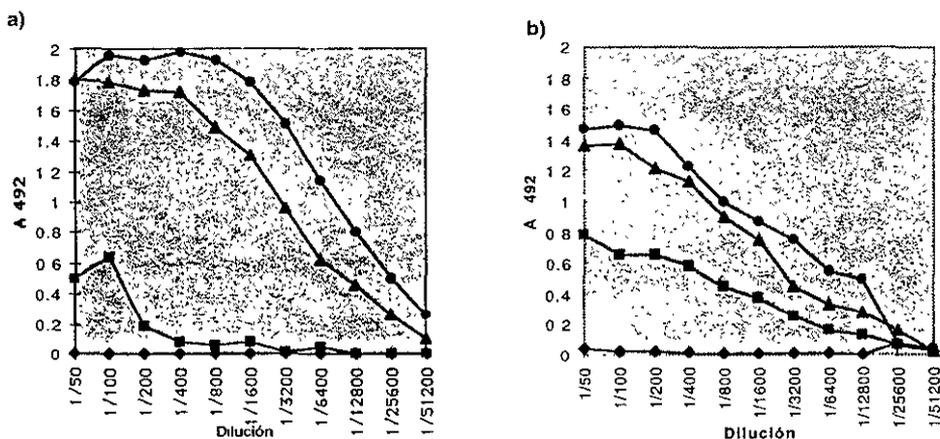


Fig 7 Titulación de anticuerpos policlonales contra la fracción Cn F II.5 del suero hiperimmune en diluciones dobles seriadas a) de raton y b) de conejo; ◆control negativo usando BSA como antígeno, ▲ veneno total de *C. noxius*, ●Cn F II.5, ■ Cn2

Para evaluar el reconocimiento del suero policlonal de conejo anti Cn F.II.5 en dilución 1:100 hacia los componentes individuales de dicha fracción, así como la reacción cruzada hacia Cn2 se realizaron ensayos en ELISA, utilizando como antígenos: Cn F.II.5, los componentes obtenidos de CLAR de la Cn F.II.5 y la toxina Cn2 en concentración de 3 µg/ml (Fig. 8).

Los resultados mostraron que en general los péptidos de la fracción presentan reconocimiento similar con el antisuero aunque sobresalen principalmente los componentes 17.8, 17.9, 18 y Cn10 al registrar el mejor reconocimiento por los anticuerpos generados con la fracción Cn F.II.5 con absorbancias entre 1.4 y 1.7, e incluso mayores que el de absorbancia registrado por la fracción Cn F.II.5 completa (abajo de 1.4 unidades). Los componentes que tuvieron el menor reconocimiento por el antisuero son los 24.1, 24.2 y 25 con lecturas de 0.3 a 0.5. La Cn2 fue reconocida por el suero anti Cn F.II.5 de manera moderada registrando 0.7 unidades.

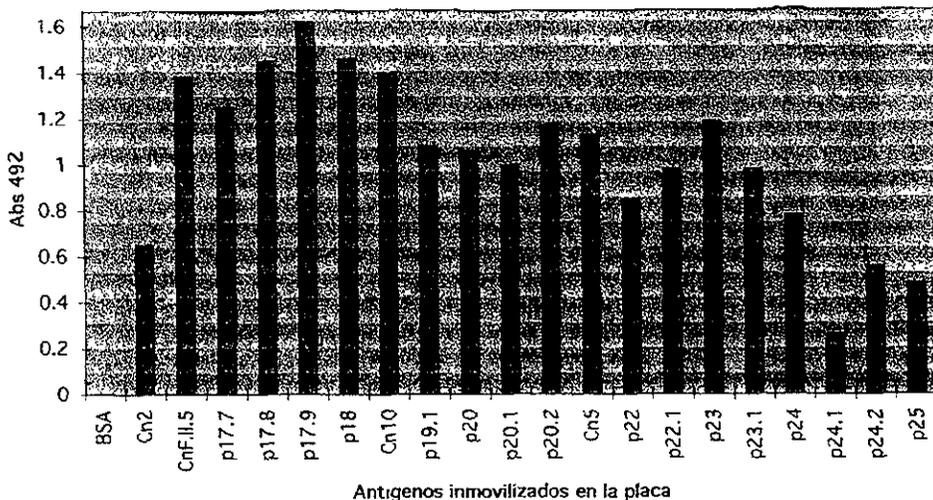


Fig 8. ELISA de reactividad del suero policlonal de conejo generado por la fracción Cn F.II.5 diluido 1:100 y usando como antígeno cada uno de los componentes purificados de la fracción del 17.7 al 25 y la Cn2 en concentraciones de 3 µg/ml

El BCF2 se utilizó para evaluar la presencia del epítipo neutralizante de Cn2 reconocido por este monoclonal sobre los componentes purificados de la Cn F.II.5 (fig. 9). Los resultados de este ensayo mostraron que los componentes de esta fracción no fueron reconocidos por el anticuerpo monoclonal BCF2 pues las lecturas de los péptidos de la fracción no rebasaron la lectura registrada por el control negativo, BSA. En tanto que el valor registrado por el control positivo, Cn2, presenta una lectura de 1.3 unidades a 492 nm.

### Evaluación de la capacidad protectora de los anticuerpos anti Cn F.II.5 en ensayos de reto directo.

Los ensayos de protección en ratones se realizaron para verificar la capacidad neutralizante *in vivo* del suero generado por la fracción Cn F.II.5. Nos referimos por capacidad protectora al reto directo de la toxina más importante del veneno, la Cn2, o el veneno total de *C. novius* en ratones previamente inmunizados con la Cn F.II.5.

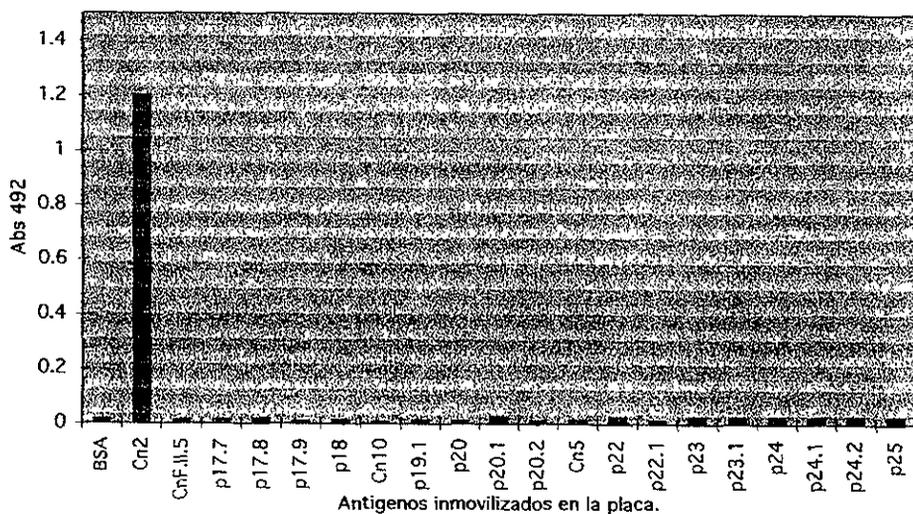


Fig 9 ELISA de reactividad del anticuerpo monoclonal BCF2 12 µg/ml contra la Cn2 y los componentes purificados de la fracción Cn F.11.5 del 17.7 al 25 en diluciones de 3 µg/ml.

Para el reto directo utilizamos 35 ratones inmunizados con Cn F.11.5, divididos en dos grupos experimentales de 18 y 17 animales. Los 20 ratones inmunizados con Adyuvante de Freund y PBS fueron divididos en dos grupos de 10 animales y utilizados como grupos control. El grupo de 17 ratones inmunizados y un grupo control fueron inyectados intraperitonealmente con 5.2 µg de veneno total de *C. noxius* (una  $DL_{50}$ ) por cada 20 g de ratón (tabla 5a). En el grupo control se observa una sobrevida de 6 de 10 ratones retados, lo que nos da un porcentaje de sobrevida del 60%, en tanto que en el grupo de ratones inmunizados y retados con el veneno total de *C. noxius* se obtuvo una sobrevida de 2 de 17 ratones inyectados mostrando solamente un 11.7% de sobrevida.

El ensayo de reto directo con la toxina Cn2, se realizó aplicando dosis de 0.25 µg de toxina (una  $DL_{50}$ ) por 20 g de peso del ratón. Los resultados se muestran en la tabla 5b donde se observa que la sobrevida para el grupo control

Tabla 5. Reto directo para evaluar protección *in vivo* de ratones inmunizados con la fracción Cn F.II.5 del veneno de *C. noxius*, a) contra el veneno total soluble de *C. noxius* b) contra Cn2. ambas aplicaciones se realizaron por vía intraperitoneal.

a)

	Número de ratones.	µg de toxinas / 20g de peso de ratón.	Sobrevida.	Porcentaje de supervida.
control	10	5.2	6/10	60
exp.	17	5.2	2/17	11.7

b)

	Número de ratones.	µg de toxina /20 g de peso de ratón.	Sobrevida.	Porcentaje de supervida.
control	11	0.25	9/11	81.8
exp.	18	0.25	6/18	33.3

fue de 9 de 11 ratones con un 81.8%. En tanto que en el grupo de 18 animales inmunizados con Cn F.II.5 se obtuvo una supervida de 6 ratones con un porcentaje de 33.3%

#### **Evaluación de la capacidad protectora de los anticuerpos anti Cn F.II.5 en ensayo de reto en terceros.**

Para evaluar la capacidad neutralizante *in vitro* del suero de conejo anti Cn F.II.5 ante el reto con la toxina Cn2 se utilizaron diferentes dosis de suero de conejo anti Cn F.II.5. se mezclaron con una DL<sub>50</sub> de Cn2 durante una hora en agitación constante y temperatura ambiente (tabla 6.). Los grupos controles utilizados en este reto consistieron en dos grupos de 4 ratones no inmunizados que se inyectaron como sigue: 1) El primer grupo fue inyectado con 0.25 µg de Cn2 por 20 g de peso de ratón en 200 µl de PBS, por vía intraperitoneal, con una supervida leída a las 24 horas de 2 ratones (50% de supervida). 2) El segundo grupo fue inyectado sólo con 100 µl de suero de conejo anti Cn F.II.5 y 100 µl de PBS, registrando una supervida del 100%.

Tabla 6. Ensayo de neutralización *in vitro* de la toxina Cn2 por el antisuero policlonal de conejo generado usando la fracción Cn F.II.5 del veneno del alacrán *C. noxius* como antígeno.

Número de ratones.	µg de toxina / 20g de peso de ratón.	µl de antisuero	Sobrevida.	Porcentaje de sobrevida.
4	0.25	0	2/4	50
4	0	100	4/4	100
4	0.25	50	1/4	25
4	0.25	100	2/4	50
4	0.25	200	4/4	100
4	0.375	200	2/4	50

Los siguientes grupos experimentales se conformaron igualmente de 4 ratones y fueron inyectados con 200 µl en volumen final de: 1) El primer grupo experimental se inoculó con 50 µl de suero hiperinmune de conejo, 0.25 µg de Cn2 por 20 g de ratón y se ajustó a 200 µl con PBS. La sobrevida registrada para este grupo fue sólo de uno de cuatro ratones (25% de sobrevida). 2) El siguiente grupo fue inyectado con 100 µl de suero de conejo, 0.25 µg de Cn2 por 20 g de ratón y se ajustó a 200 µl con PBS; los ratones que sobrevivieron al reto después de 24 horas fueron 2 de 4 (50 % de sobrevida). 3) Al tercer grupo se le aplicó una mezcla de 200 µl de suero hiperinmune con 0.25 µg de Cn2 por 20g de ratón; este grupo registró una sobrevida de 4 ratones (100%). Por lo cual se procedió a realizar un nuevo reto aplicando 1.5 DL<sub>50</sub> de Cn2 (0.375 µg de Cn2 por 20g de ratón) y 200 µl de suero hiperinmune anti Cn F.II.5 de conejo, la sobrevida registrada en este caso fue de 50%.

## DISCUSION.

La fracción Cn F.II.5 contiene a las dos toxinas contra artrópodos del veneno de *C. noxius* conocidas a la fecha (García *et al.* 1997; Selisko *et al.* 1996). Los estudios de toxicidad de la fracción Cn F.II.5 indican que esta fracción muestra bajos niveles de toxicidad en mamíferos (Possani *et al.* 1981 a) y que los porcentajes de similitud de Cn5 y Cn10 contra Cn2 son elevados (tabla 1).

El trabajo bioquímico fue elaborado con el fin de obtener la mayor información posible sobre la fracción Cn F.II.5 y compararla con las propiedades inmunogénicas de ésta en ratones y conejo.

La cromatografía por CLAR de la fracción, evidenció la gran cantidad de péptidos existentes en esta sola fracción, al registrar al menos 24 componentes separados en la columna semipreparativa (fig 6). Sólo para 19 de los 24 péptidos purificados se obtuvo la secuencia y se sometieron a análisis comparativo contra secuencias ya reportadas como Cn2 y NTX; esto debido a que algunas veces el material purificado fue muy escaso e insuficiente para realizar la determinación de la secuencia o las secuencias resultantes no fueron suficientes para hacer las comparaciones.

Al realizar los análisis de las secuencias amino terminales de los 19 péptidos tóxicos que corresponden a diferentes porcentajes de la Cn F.II.5, se observó que éstas poseen ligeras diferencias en residuos que propician la especificidad y afinidad de cada una. De estas toxinas para dos se tiene la secuencia completa (Cn5 y Cn10) y para otras 6 ya se habían obtenido secuencias parciales (18, 20, 22, 23, 24 y 25) pero aún no reportadas en la literatura.

De las 19 secuencias reportadas en esta tesis, (tabla 3.), se puede observar que la mayoría de ellas corresponden a toxinas contra canales de sodio, basándose en el análisis comparativo de las secuencias obtenidas contra la Cn2 usando el programa FASTA

(GCG Inc.), que realiza alineamientos y muestra porcentajes de identidad con secuencias del banco de datos o con secuencias ingresadas por el usuario. Los 11 péptidos secuenciados que mostraban más de 10 residuos (Cn10, 19.1, 20, 20.2, Cn5, 21.1, 22, 23, 24, 24.2 y 25) tuvieron un porcentaje de identidad mayor al 63% con Cn2. Otras 2 toxinas secuenciadas: 17.2 y 17.5 podrían afectar canales de potasio pues muestran un porcentaje de identidad con NTX de 51% y 38% respectivamente. Además es de hacer notar que el péptido 17.2 muestra más del 70% de identidad contra la Margatoxina (MTX), una toxina contra canales de potasio presente en el veneno de *C. margaritatus*.

Una revisión de las diferentes fracciones obtenidas de la cromatografía de intercambio iónico de la fracción F.II que han sido repurificadas en CLAR, demuestra que algunos de los péptidos menos abundantes en la Cn F.II.5 se presentan en una mayor proporción en otras fracciones. Ejemplo es el componente 17.2. que en la fracción Cn F.II.5 se encuentra en menos del 0.4% del total de la proteína presente en la fracción, pero también se encuentra en la fracción Cn F.II.9, donde el porcentaje es mucho mayor (2.7%) y las secuencias parciales son idénticas.

Sobre los ensayos de toxicidad de la fracción Cn F.II.5, es de hacer notar que aunque en esta fracción se ubican toxinas que actúan contra artrópodos, éstas tienen una afinidad menor a canales de sodio de mamíferos (García *et al.* 1997; Selisko *et al.* 1996), y que una vez inyectados en dosis elevadas pueden causar efectos tóxicos o letales, como el observado al aplicar dosis de 500 µg por 20 g de peso de ratón (tabla 4a). El reto de toxicidad en artrópodos se realizó en cochinillas, presentando niveles de toxicidad y letalidad similares a los retos contra mamíferos; esto es la dosis mínima en la cual se observaron síntomas de toxicidad y letalidad en ratones fue con 25 µg por gramo, mientras que en crustáceos la dosis mínima que mostró efectos tóxicos fue también, 25 µg por gramo, aun cuando la letalidad se registró en dosis de 30 µg por gramo de *A. vulgare* (tabla 4b).

Si bien en la fracción Cn F.II.5 se encuentran toxinas de alta afinidad contra artrópodos como la Cn5 y Cn10, para el resto de las toxinas presentes en la fracción no

se ha determinado aún la afinidad sobre canales iónicos. Es muy posible que se encuentren toxinas de sodio con alta afinidad a canales de mamíferos, sugerido por la identidad en las secuencias amino terminales de algunas de ellas y la Cn2 (entre 75% y el 63.6% para los péptidos 19.1, 21.1, 22, 24, 24.2), sin tomar en cuenta los péptidos dirigidos a canales de potasio como el 17.2 y 17.5 que también aportan sus efectos tóxicos cuando son aplicados en dosis elevadas. Con el fin de entender la potencia de la Cn F.II.5 nosotros calculamos que la concentración de Cn F.II.5 que mostró letalidad sobre ratones es comparable con la picadura de más de 50 alacranes, relacionado por la cantidad total de proteína soluble del veneno de *C. noxius*.

En relación a la evaluación de la capacidad inmunogénica de la fracción Cn F.II.5 utilizando los protocolos de inmunización descritos en la tabla 2, demostramos que esta fracción es un buen inmunógeno a partir de los títulos de anticuerpos, detectados por ELISA, contra la propia Cn F.II.5 (fig. 7). También nuestros resultados indican que la similitud observada en la secuencia para un buen número de componentes de la fracción Cn F.II.5 con la Cn2 y otras toxinas del veneno resulta en la presencia de epítomos compartidos. Esto fue mostrado a partir de la reacción cruzada del suero anti Cn F.II.5 contra Cn2 (fig. 8).

Cuando se realizaron los ensayos de ELISA para evaluar el reconocimiento de cada uno de los péptidos purificados en la Cn F.II.5 por el suero anti Cn F.II.5, se observó una fuerte reactividad hacia los péptidos principalmente dirigidos contra canales de sodio y en particular hacia el 17.8, 17.9, 18 y Cn10 (fig. 8). De éstos, sólo para Cn10 se conoce la secuencia completa y muestra 51.1% de identidad a Cn2. Las secuencias amino terminales que de los otros tres péptidos se obtuvieron, tienen un muy bajo número de residuos reconocidos y no permiten la comparación con la Cn2 u otras toxinas de alacrán. Las toxinas que muestran el mayor porcentaje de identidad con Cn2 son: 24 con 75%, 24.2 con 75%, 19.1 con 71.4%, 21.1 que presenta un 68.2% y 22 con 63.6%, pero los anticuerpos policlonales del suero muestran lecturas iguales o menores a 1.0 a 492 nm y para los péptidos 24 y 24.2 las lecturas fueron menores (de 0.8 y 0.6 unidades respectivamente). Los datos anteriormente analizados concuerdan con la

reactividad mostrada de los anticuerpos anti Cn F.II.5 en reacción cruzada con Cn2 pues se registra una lectura cercana a 0.7 unidades de absorbancia.

El uso de un anticuerpo monoclonal capaz de bloquear la acción tóxica de Cn2, como el BCF2, en ensayos de reconocimiento de los componentes de la Cn F.II.5, en ELISA, nos permitió evaluar si el epítoto o epítotos que reconoce este monoclonal se encuentra presente en los componentes de la fracción (fig. 9). Los resultados muestran que ninguna de las toxinas purificada en la Cn F.II.5 tiene un epítoto que sea reconocido por BCF2, en otras palabras, la unión de los anticuerpos policlonales a Cn2 se lleva a cabo en sitios de la toxina que no actúan en el reconocimiento y unión al receptor del canal de sodio, en contraste con lo propuesto sobre la interacción del BCF2 y Cn2 (Selisko *et al.* 1998; Calderón-Aranda *et al.* 1998).

En las pruebas de neutralización de la Cn2 *in vitro*, usando el suero policlonal de conejo anti Cn F.II.5 (tabla 6.), se corrobora lo mencionado con anterioridad, pues para observar la capacidad neutralizante del suero fue necesario usar 200  $\mu$ l de éste para bloquear en 100% la letalidad de un sola DL<sub>50</sub> y al mezclar 1.5 DL<sub>50</sub> con 200  $\mu$ l de suero de conejo el porcentaje de mortandad muestra un comportamiento similar al grupo control, con un 50% de sobrevivida. La unión de anticuerpo anti Cn F.II.5 a la Cn2 es capaz de neutralizar su efecto tóxico posiblemente por impedimento estérico entre la Cn2 y el receptor del canal pero no con la eficiencia mostrada por BCF2 (Licca *et al.* 1996 a). Al mezclar 50  $\mu$ l de suero hiperinmune de conejo el porcentaje de letalidad fue mayor al grupo control pero basándonos en el escaso número de ratones utilizados la muerte de uno solo de ellos aporta un 25% del total, así que si el ensayo se realizara en un grupo mayor de ratones muy seguramente el porcentaje de mortandad se modificaría. El grupo que fue retado con 100  $\mu$ l de suero hiperinmune y una DL<sub>50</sub> de Cn2 presenta el mismo porcentaje de letalidad que el grupo control.

El reto directo realizado en ratones se desarrolló para evaluar la capacidad protectora ante el veneno total y Cn2, en animales que se sometieron a un programa de inmunización inoculando como antígeno a la fracción Cn F.II.5. En un inicio la

inmunización se realizó con 1.44  $\mu\text{g}$  y posteriormente se usó 0.55  $\mu\text{g}$  de la fracción por ratón. Como este antígeno es una mezcla de toxinas no pueden utilizarse grandes cantidades de él y aún cuando la dosis tóxica de la fracción es mucho mayor no es necesaria una mayor cantidad de antígeno en ratones como lo muestra la figura 7, donde se observa un buen título de anticuerpos policlonales contra la Cn F.II.5. Al disminuir la cantidad de antígeno en las reinmunizaciones se seleccionan los linfocitos que presentan inmunoglobulinas con mayor afinidad hacia el antígeno (Goild *et al.* 1968)

Los resultados del reto directo indican una fuerte sensibilización contra el veneno total como contra la Cn2 y es aún más evidente en el reto ante la Cn2, pues aparentemente la dosis utilizada estaba por debajo de la  $DL_{50}$  reportada en la literatura, como se puede apreciar en el grupo control, donde la sobrevida esperada era del 50% y se registró un valor significativamente superior (81.8%) (tabla 5).

Existen varias posibilidades para explicar el fenómeno de sensibilización:

En un primer caso el problema podría explicarse en términos de la farmacocinética de las toxinas y la seroterapia utilizada contra el envenenamiento. Una vez que ingresa la toxina en el cuerpo por vía subcutánea la distribución de la misma al torrente sanguíneo es rápida y aún es más veloz si la aplicación del veneno es intraperitoneal (Rezende *et al.* 1995; Ismail *et al.* 1996). La eliminación se hace casi total a las dos horas de haber ingresado al torrente sanguíneo (Revelo *et al.* 1996, Santana *et al.* 1996). Los parámetros de farmacocinética de la toxina se alteran al formarse el complejo antígeno-anticuerpo (Scherrmann y Pepin 1996); la toxina se ve atrapada en el compartimento donde es retenida por un tiempo mucho mayor al normal, pudiendo mantenerse por más de un día antes de ser eliminada (Ismail *et al.* 1993) y, si este anticuerpo no interfiere con la funcionalidad de la toxina, esta podría seguir actuando por tiempos prolongados. Con esto se explicaría la disminución en los porcentajes de sobrevida al realizar los retos directos, pero esto no sustenta los fenómenos de sintomatología observados, donde la aplicación de la toxina o el veneno total actúan de una forma más agresiva, mostrando alta toxicidad y matando al animal en tiempos más cortos y con síntomas más evidentes;

además, el fenómeno se vería repetido en los ensayos de neutralización *in vitro*, donde si bien la distribución del complejo antígeno-anticuerpo tomaría mayor tiempo, la potencialidad del veneno sería parecida al reto directo y la sintomatología similar.

Por otro lado, esta sensibilización puede encontrar su explicación al tomar en cuenta la forma en como este antígeno es procesado y presentado por las células del sistema inmune, es decir, interacción entre linfocitos B y linfocitos T para generar una respuesta inmune a un antígeno particular. Cuando ingresa la toxina en el cuerpo, ésta es atrapada por linfocitos B y macrófagos; los macrófagos y los linfocitos B la digieren; posteriormente un fragmento de la toxina es combinado con una proteína presentadora de antígeno conocida como CMH II; el complejo antígeno-CMH II es reconocido por los receptores de los linfocitos T; si estos linfocitos son T ayudadores, producen interleucinas destinadas a estimular la proliferación, maduración y cambio de la Fc de los anticuerpos generados por las células plasmáticas (revisado por Kishimoto y Hirano 1989).

Es precisamente la interleucina 4 (IL-4), la que induce a la generación de IgE e IgG<sub>1</sub> preferentemente sobre las IgG<sub>2</sub> e IgG<sub>3</sub> (Coyle *et al.* 1995). Las IgE son anticuerpos que se producen principalmente en invasiones parasitarias, además de ser las responsables junto con las IgG<sub>1</sub> de los fenómenos de alergias o anafilaxia (revisado por Benacerraf y Unanue, 1986). Cuando una IgE o IgG<sub>1</sub> se une a un antígeno en el torrente sanguíneo o linfático, este complejo es reconocido por macrófagos, mastocitos o basófilos por medio de un receptor conocido como receptor para la fracción constante tipo E (RFc<sub>E</sub>) (Fung-Leung *et al.* 1996). Una vez unido el RFc<sub>E</sub> con el complejo antígeno-IgE, aun cuando al menos dos IgE unidos al mismo antígeno y sus Fc se unen a otros RFc<sub>E</sub> de la misma célula. Esto desencadena reacciones que provocan la liberación de histamina (Djukanovic *et al.* 1990).

La histamina es una amina vasoactiva que actúa sobre el músculo liso; en el caso del ratón, la histamina provoca a los pocos minutos de inyectar el antígeno agitación y piloerección debido a la contracción del músculo liso de los folículos pilosos; dificultad

para respirar debido a la contracción de espástica del árbol bronquial que origina al animal la incapacidad para exhalar el aire inhalado. Hay un descenso precipitado de la presión arterial, el animal se enfría y torna humedo y sufre un choque vascular provocado por la vasodilatación de las vénulas y el aumento de la permeabilidad vascular con pérdida de líquidos y proteínas de la circulación (revisado por Benacerraf y Unanue, 1986).

Todos estos síntomas pueden combinarse, enmascarse y confundirse con los síntomas provocados por la toxina; así pues el responsable directo de la muerte del animal no es la toxina, sino el anticuerpo generado contra ella, al combinarse con el antígeno y ser reconocida por los basófilos.

Las IgE son especie específicas o por lo menos estos anticuerpos sólo pueden ser reconocidos por basófilos y mastocitos de especies estrechamente relacionadas (Ra *et al* 1989). Esto podría explicar el que no se observen estos fenómenos en los retos indirectos en ratón utilizando antisuero de conejo (tabla 6).

Evidentemente ambas posibilidades están sujetas a comprobación, pero los resultados obtenidos en esta tesis favorecen a la segunda opción; trabajos futuros podrían enfocarse en la identificación de las IgE en ensayos de ELISA, cuantificación de la histamina en la sangre de ratones inmunizados y retados con fragmentos de péptidos sintéticos correspondientes a toxinas como la Cn2 o antígenos no tóxicos como la Cn F.II.5 y observar los síntomas característicos de anafilaxia.

## CONCLUSIONES.

La fracción Cn F.II.5 contiene 24 componentes distintos y 13 de ellos muestran un alto porcentaje de identidad a Cn2, NTX o MTX.

La toxicidad de la fracción Cn F.II.5 es muy similar en los retos sobre mamíferos y crustáceos (2.5 µg / g de ratón y 30 µg / g de *A. vulgare*).

La fracción Cn F.II.5 usada como antígeno es capaz de levantar una respuesta inmunogénica que muestra reacción cruzada ante Cn2 y veneno total de *C. noxius*.

La inmunización con Cn F.II.5 en ratones produce hipersensibilización al retar a los animales con Cn2 y veneno total de *C. noxius*.

La neutralización *in vitro* con suero de conejo anti Cn F.II.5 es capaz de bloquear la acción de 7.5 DI<sub>50</sub> con 1 ml de suero.

## **PERSPECTIVAS.**

Comprobar la existencia de reacción cruzada entre BCF2 y diferentes fracciones no tóxicas del veneno de *C. noxius*, para evaluar la posible utilidad de la o las toxinas responsables en la generación de anticuerpos capaces de bloquear la acción tóxica de Cn2, a partir de la presencia del epítipo neutralizante reconocido por este anticuerpo monoclonal.

Titular las IgE presentes en los sueros murino hiperinmunes a Cn F.II.5 en ensayos de ELISA.

Ensayar en reto directo, utilizando a la Cn F.II.5, en animales inmunizados con este mismo antígeno para evaluar el desarrollo de anafilaxia.

Realizar la purificación y digestión de los anticuerpos murinos generados por la Cn F.II.5 con pepsina para eliminar la Fc de las Ig, que pudieran estar involucrados en la sensibilización.

## REFERENCIAS.

- Abbas, A.K., A.H. Lichtman, J.S. Pober 1994. *General properties of immuneresponses* En: *Cellular and Molecular Immunology*. W.B Saunders Co 2nd ed Philadelphia
- Agnew, W.S., S.R. Levinson, J.S. Brabson y M.A. Raftery. 1978. Purification of the tetrodotoxin-binding component associated with the voltage-sensitive sodium channel from *Electrophorus electricus* electrophore membranes Proc Natl. Acad. Sci USA. 75:2606-2610
- Almasy, R.J., J. C. Fontecilla-Camps, F. L. Suddath and C.E. Bugg. 1983 Structure of variant-3 scorpion neurotoxin from *Centruroides sculpturatus* Ewing, refined at 1.8 Å resolution. J. Mol Biol 170:497-527
- Alzari, P.M., M. Lascombe and R.J. Poljak 1988 Three-dimensional structure of antibodies. Annual Review of Immunology 6 555-580.
- Amit, A.G., R.A. Mariuzza, S.E.V. Phillips and R.J. Poljak. 1986 Three-dimensional structure of an antigen-antibody complex at 2.8 Å resolution. Science 233 747-753
- Auld, V. J., A.L. Goldin, D.S. Krafte, W.A. Caterall, H.A. Lester, N. Davidson y R.J. Dunn 1990 A neutral amino acid change in segment IIIS4 dramatically alters the gating properties of the voltage-dependent sodium channel. Proc. Natl. Acad. Sci USA. 87: 323-327
- Barchi, R.L. 1988 Probing the molecular structure of the voltage-dependent sodium channel. Annu Rev. Neurosci 11. 455-495
- Becerril, B., A. Vazquez, C. García, M. Corona, F. Bolívar and L. Possani. 1993. Cloning and characterization of cDNAs that code for Na<sup>+</sup>-channel-blocking toxins of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. Gene 128 165-171.
- Benacerraf, B. y J. R. Unanue 1984. *Anticuerpos y sus funciones*. En: *Inmunología*. Ed. med Panamericana 2da ed. Buenos Aires.
- Bohuhaouala-Zabar, B. F. Duncancel, I. Zenouaki, R. Ben Khalifa, I. Borhani, M. Pelhate, L.C. Boulam, M. El Aych, A. Menéz and H. Karout. 1996 A recombinant insect-specific  $\alpha$ -toxin of *Buthus occitanus tunetanus* scorpion confers protection against homologous mammalian toxins. Eur. J Biochem. 238.653-660
- Burton, D.R. 1987. Structure and function of antibodies. Eds. Calabi F. and M.S. Neuberger. *Molecular genetic of Immunoglobulins*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam
- Calderón-Aranda, E., D. Hozbor and L. Possani. 1993 Neutralizing capacity of murine sera induced by different antigens of scorpion venom. Toxicon 31:327-337
- Calderón-Aranda, E., T. Olamendi-Portugal, and L. Possani 1995 The use of synthetic peptides can be a misleading approach to generate vaccines against scorpion toxins. Vaccine. 13 1198-1206
- Calderón-Aranda, E.S., M. Dehesa-Dávila, A. Chavez-Haro y L. Possani 1996. Scorpion stings and their treatment in México. Eds. C. Bon and M. Goyffon. *Envenomings and their Treatments*. Fondation Marcel Méricux, Lyon.
- Calderón-Aranda, E., B. Selisko, G. Gurtola, E. York, J. Stewart, L. Possani. 1998. Mapping of an epitope

recognized by a neutralizing monoclonal antibody specific to toxin Cn2 from the scorpion *Centruroides noxius*, using discontinuous synthetic peptides Sometido.

Carbonc, F., E. Wanke, G. Prestipino, L. Possani, and A. Maelicke. 1982. Selective blockage of voltage-dependent K<sup>+</sup> channels by a novel scorpion toxin. *Nature*, 296 90-91

Caterall, W. A. 1988. Structure and function of voltage-sensitive ion channels. *Science* 242 50-61.

Caterall, W. A. 1976. Purification of a toxic protein from scorpion venom which activates the action potential Na ionophore. *J. Biol. Chem.* 251:5528

Caterall, W. A. 1991. Structure and function of voltage-gated sodium and calcium channels. *Curr Opin Neurobiol* 1 5-13.

Chávez-Olórtegui, C., A. Moreira-Ferreira, M. do Nascimento Cordeiro, W. Maria, M. Richardson and C. Diniz. 1996. Immunological and chemical properties of a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Itiys serrulatus* (Lutz & Mello Campos, 1922) Eds. C. Bon and M. Goyffon. *Envenomings and their Treatments* Fondation Marcel Merieux, Lyon

Chávez-Olórtegui, C., E. Kalapothakis, A. Moreira-Ferreira, A. Ferrereira and C. Diniz. 1997. Neutralizing capacity of antibodies elicited by a non-toxic protein purified from the venom of the scorpion *Tityus serrulatus*. *Toxicon* 35 213-221

Couraud, F., E. Jover, J. M. Dubois and H. Rochat. 1982. Two types of scorpion toxin receptor sites, one related to the activation, the other to the inactivation of the action potential sodium channel. *Toxicon*, 20 9-16

Coyle, A., G. Le Gros, C. Bertrand, S. Tsukuki, C. Heusser, M. Kopf and G. Anderson. 1995. IL-4 is required for the induction of lung Th2 mucosal immunity. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 13 54-59

Davies, D. R., S. Sheriff and I. A. Padlan. 1988. Antibody-antigen complexes. *The Journal of Biological Chemistry*, 263:10541-10544

Debin, J. A. and M. Strichartz. 1993. Purification and characterization of chloride channel ligand from the venom of the scorpion. *Am. J. Physiol.* 264:3361.

Declan, A., J. Morais Cabral, R. Pfuetzner, A. Kuo, J. Gulbis, S. Cohen, B. Chait, R. Mackinnon. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K<sup>+</sup> conduction and selectivity. *Science* 280 69-76

Dehesa-Dávila, M. y L. Possani. 1994. Scorpionism and serotherapy in México. *Toxicon* 32:1015-1018.

Dent, M. A., L. Possani, G. A. Ramirez and P. L. Fletcher. 1980. Purification and characterization of two mammalian toxins from the venom of the Mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 18 343-350

Devaux, C., P. Fourquet and C. Gramier. 1996. A conserved sequence region of scorpion toxins rendered immunogenic induces broadly cross-reactive, neutralizing antibodies. *Eur. J. Biochem.* 242:727-735.

Devaux, C., O. Clot-Faybessé, M. Juin, K. Mabrouk, J.-M. Sabatier and H. Rochat. 1997. Monoclonal antibodies neutralizing the toxin II from *Androctonus australis* Hecctor scorpion venom: usefulness of a synthetic, non-toxic analog. *FEBS letters* 412:456-460

- Djukanovic, R., W. Roche, J. Wilson, C. Beasley, O. Twentyman, P. Howarth and S. Holgate. 1990. Mucosal inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 142:434-457
- Dolimbek, B., and Z. Atassi. 1996. Protection against  $\alpha$ -bungarotoxin poisoning by immunization with synthetic toxin peptides. *Mol Immunol*. 33:681-689
- Engelhard, V H 1994. Presentación celular de los antígenos. *Investigación y Ciencia* 10.44-51
- Flores, R. 1963. Observaciones sobre sintomatología y tratamiento de la intoxicación por picadura de alacrán. *Rev. Inst Salubr Enferm. Trop (Méx)* 23:175-179.
- Fontecilla-Camps, J C , R.J. Almassy, F I. Suddath, D.D. Walt and C E Bugg 1980 Three-dimensional structure of a protein from scorpion venom: a new structural class of neurotoxins. *PNAS USA* 77 6496-6500
- Fung-Leung, W , De Souza-Hitzler, A. Ishaque, L. Zhou, J. Pang, K. Ngo, J. Panakos, Chourmouzis, F. Liu and C. Lau. 1996 Transgenic mice expressing the human high-affinity immunoglobulin (Ig)E receptor chain respond to human IgE in mast cell degranulation and in allergic reactions. *J. Exp. Med.* 183 49-56
- García, C., B. Becerril, B. Selisko, M. Delepiere and L. Possani 1997. Isolation, characterization and comparison of a novel crustacean toxin with a mammalian toxin from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *Comp Biochem Physiol* 116B:315-322
- Goidl, E , W. Paul, G. Siskind and B. Benacerraf. 1968. The effect to antigen dose and time after immunization on the amount and affinity of anti-hapten antibody. *J. Immunol.* 100:371.
- Gordon, D., M. Martin-Fauclair, S. Cestele, C. Kopeyan, F. Carlier, R. Khalifa, M. Pelhate and H. Rochat. 1996. Scorpion toxins affecting sodium current inactivation bind to distinct homologous receptor sites on rat brain and insect sodium channels. *J Biol Chem* 271:8034-8045
- Granier, C , J. Novotny, J. C. Fontecilla-Camps, P. Fourquet, M. El Aych and E. Bahraoui. 1989. The antigenic structure of a scorpion toxin. *Mol Immunol* 26.503-513.
- Gurrola, G., G. Moreno-Hagelsieb, I. Zamudio, M. García, X. Sobetón and L. Possani. 1994. The disulfide bridges of toxin 2 from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann and its three-dimensional structure calculated using the coordinates of variant 3 from *Centruroides sculpturatus*. *FEBS letters* 347 59-62.
- Hille, B 1992. Ionic channel of excitable membranes. 2a Ed. Sinauer associates inc. Massachusetts 607 pp
- Isaacs, J., M. Wing, J. Greenwood, B. Hazleman, G. Hale and H. Waldman. 1996. A therapeutic human IgG4 monoclonal antibody that depletes target cells in humans. *Clin Exp Immunol*, 106.427-433.
- Ismail, M 1993. Serotherapy of the scorpion envenoming syndrome is irrational. *Toxicon* 31 1077
- Ismail, M and M.A. Abd-Elisalam 1996. Serotherapy of scorpion envenoming: Pharmacokinetics of antivenoms and a clinical assessment of their usefulness. *Fds. C. Bon and M. Goyffon. Envenomings and their Treatments.* Fondation Marcel Méneux, Lyon

- Kharrat, R., I. Zenouaki, Z. Ben Lasfar, K. Miled and M. El Ayeb. 1996a. Molecular characterization, antigenicity and immunogenicity of anatoxic polymeric forms conferring protection against scorpion venom. *Toxicon* 35:915-930.
- Kharrat, R., K. Mabrouk, M. Crest, H. Darbon, R. Oughidni, M. Martin-Eauclaire, G. Jacquet, M. El Ayeb, J. Van Riettschoten, H. Rochat and J. Sabatier. 1996b. Chemical synthesis and characterization of maurotoxin, a short scorpion toxin with four disulfide bridges that acts on K<sup>+</sup> channels. *Eur. J. Biochem.* 242, 491-498.
- Kishimoto, T. and T. Hirano. 1989. B Lymphocyte activation, proliferation and immunoglobulin secretion. Ed. F-d. Paul. W. Fundamental Immunology. 2nd edition. Raven press Ltd. New York.
- Kobayashi, Y., H. Takashima, H. Tamaoki, Y. Kyogoku, P. Lambert, h. Kuroda, n. Chino, T.X. Watanabe, I. Kimura, S. Sakakibara and et al. 1991. The cystine-stabilized alpha-helix: a common structural motif of ion-channel blocking neurotoxic peptides. *Biopolymers*, 31: 1213-1220.
- Landon, J. and D.C. Smith. 1996. Development of novel antivenom based on specific ovine Fab. Eds. C. Bon and M. Goyffon. Envenomings and their Treatments. Foundation Marcel Méricux, Lyon.
- Lebricon, F., M. Delepiere, A.N. Ramirez, C. Balderas and L. Possani. 1994. Primary and NMR three-dimensional structure determination of a novel crustacean toxin from the venom of the scorpion *Centruroides limpidus limpidus* Karsch. *Biochemistry*, 33: 11135-11149.
- Licca, A., B. Becerril and L. Possani. 1996a. Fab fragment of the monoclonal antibody BCF2 are capable of neutralizing the whole soluble venom from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 34:843-847.
- Licca, A. I. 1996b. Clonación y expresión de la región variable del anticuerpo monoclonal neutralizante BCF2, dirigido contra la toxina 2 del alacrán *Centruroides noxius*. Tesis de doctorado. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología UNAM.
- Loret, F. P., M. F. Martin-Euclaire, P. Mansuelle, F. Sampieri, C. Granet and H. Rochat. 1991. An anti-insect toxin purified from the scorpion *Androctonus australis* Hector also acts on the  $\alpha$  and  $\beta$  mammalian sodium channel, sequence and circular dichroism study. *Biochemistry*, 30: 633-640.
- Meves, H., J. M. Smard and D.D. Walt. 1984. Biochemical and electrophysiological characteristics of toxins isolated from the venom of the scorpion *Centruroides sculpturatus*. *J. Physiol., Paris*, 79: 185-191.
- Miller, J. A., W. S. Agnew y S. R. Levinson. 1983. Principal glycopeptide of the tetrodotoxin / saxitoxin binding protein from *Electrophorus electricus*. Isolation and partial chemical and physical characterization. *Biochemistry* 22: 462-470.
- Moreira-Iruena, A., I. Kalapothakis, C. Dmiz and C. Chávez-Olortegui. 1998. *In vivo* protection against *Tityus serrulatus* scorpion toxins by immunization of mice with a non-toxic protein. *Toxicon* 36: 333-339.
- Nieto, A.R., G.B. Guriola, I. Vaca and L. Possani. 1996. Noxiustoxin 2, a novel K<sup>+</sup> channel blocking peptide from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 34: 913-922.
- Olamendi Portugal, I., E. Gómez-Iguzas, G.B. Guriola and L. Possani. 1996. A novel structural class blocking toxin from the scorpion *pandinus imperator*. *Biochem. J.* 315:977-981.

- Pintar, A., L. Possani and M. Delepierre 1998. Solution structure of toxin 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann, a scorpion neurotoxin acting on sodium channels. *Biochemistry*. Sometido.
- Possani, L., M. A. Dent, B. M. Martin, A. Maelicke and I. Svendsen. 1981a. The amino terminal sequence of several toxins from the mexican scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Carlsberg Reg. Commun* 46:207-214.
- Possani, L., J. Fernandez de Castro and J. Z. Juliá. 1981b. Detoxification with Glutaraldehyde of purified scorpion (*Centruroides noxius* Hoffmann) venom. *Toxicon* 19:323-329.
- Possani, L., B. M. Martin and I. Svendsen. 1982. The primary structure of 'Noxiustoxin' A K<sup>+</sup> channel blocking peptide, purified from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *Carlsberg Reg. Commun* 47:285-289.
- Possani, L. 1984. Structure of scorpion toxins. En *Handbook of natural toxins*. Tu A. T ed. Vol 2:513-550 Marcel Decker, Inc. New York
- Possani, L., B.M. Martin, I. Svendsen, G. S. Rode, and B.W. Erickson. 1985. Scorpion toxin from *Centruroides noxius* and *Tityus serrulatus* Primary structures and sequence comparison by metric analysis. *J. Biochem* 229:739-750
- Ra, C., M. Jouvin, and J. Kinet 1989. Complete structure of the mouse mast cell receptor for IgE (FcR1) and surface expression of chimeric receptor (rat-mouse-human) on transfected cells. *J. Biol. Chem.* 264: 15323-15327.
- Ravecht, I. V. and J.P. Kinet 1991. Fc receptor. *Annual Review of Immunology* 9:457-492
- Revelo, M.P., E. Alves, A. P. Ferrereira, C. Ribeiro and C. Chávez-Olórtegui 1996. Body distribution of *Tityus serrulatus* scorpion venom in mice and effects of scorpion antivenom. *Toxicon* 34 1119-1125
- Rezende, N., M. Borges, D. Campolma, C. Chavez-Olórtegui, C. Ribeiro and C. Santos. 1995. Efficacy of antivenom therapy for neutralizing circulating venom antigens in patients stung by *Tityus Serrulatus* scorpions. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 52: 277-280.
- Rochat, H., P. Bernatd and T. Courad 1979. Scorpion toxins: chemistry and mode of action. En: *Advanced in Cytopharmacology*. Eds. Ceccatelli and F. Clementi Raven Press, New York. 3:325-334.
- Santana, G. C., A. C. I. Freire, A. P. L. Ferrereira, C. Chávez-Olórtegui, C. R. Diniz and L. Freire-Maia 1996. Pharmacokinetics of *Tityus serrulatus* scorpion venom determined by enzyme-linked immunosorbent assay in the rat. *Toxicon* 34:1063-1066
- Selisko, B., C. García, B. Becerril, M. Delepierre and L. Possani 1996. An insect-specific toxin from *Centruroides noxius* Hoffmann cDNA, primary structure, three-dimensional model and electrostatic surface potentials in comparison with other toxin variants. *Eur. J. Biochem.* 242:235-242
- Selisko, B., A. Licea, B. Becerril, F. Zamudio, L. Possani and E. Horjales. 1998a. Antibody BCF2 against scorpion toxin Cn2 from *Centruroides noxius* Hoffmann - primary structure and three-dimensional model as free Fv fragment and complexed with its antigen. *Prot. Sc.* Sometido.
- Selisko, B., C. García, B. Becerril, F. Gómez-Lagunas, C. Garay and L. Possani 1998b. Cobatoxins 1 and 2 from *Centruroides noxius* Hoffmann constitute a subfamily of potassium-channel-blocking scorpion toxins

Eur J Biochem. 254:468-479.

Sherriff, S., D.R. Davies and E.A. Padlan. 1990. Antibody-antigen complexes. *Annu Rev Biochem.* 59:439-473

Sherrmann, J. and S. Pepin. 1996. Biodynamics of antigen-antibody neutralization *in vivo*. Eds. C. Bon and M. Goyffon. *Envenomings and their Treatments*. Fondation Marcel Mérieux, Lyon.

Stuhmer, W., F. Conti, H. Suzuki, X. Wang, M. Noda, N. Yahagi, H. Kubo and S. Numa. 1989. Structural parts involved inactivation and inactivation of the sodium channel. *Nature (Lond.)* 339:597-603

Trimmer, J. S. and W.S. Agnew. 1989. Molecular diversity of voltage-sensitive Na channel. *Annu Rev Physiol* 51:401-418.

Unwin, N. 1989. The structure of ion channel membranes of excitable cells. *Neuron* 3:665-676

Valdivia, H.H., W. Lederer and R. Coronado. 1992. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca-release channel of skeletal and cardiac muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*. 89:12185.

Valdivia, H.H., B.M. Martin, A.N. Ramirez, P.L. Fletcher and L. Possani. 1994. Isolation and pharmacological characterization of four novel Na<sup>+</sup> channel-blocking toxins from the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *J Biochem.* 116:1383-1391

Vázquez, A., B. Becerril, B.M. Martin, F. Zamudio, F. Bolívar and L. Possani. 1993. Primary structure determination and cloning of the cDNA encoding toxin 4 of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *FEBS* 320:43-46

Vázquez, A., J.V. Tapia, W. K. Flason, B. M. Martin, F. Lebreton, M. Deleptierre, I. Possani and B. Becerril. 1995. Cloning and characterization of the cDNAs encoding Na<sup>+</sup> channel-specific toxins 1 and 2 of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffmann. *Toxicon* 33:1161-1170.

Wheeler, K. P., D. D. Walt, and M. Landanski. 1983. Classification of Na channel receptors specific for various scorpion toxins. *Pflügers Arch* 397:164-165

Zamudio, F., R. Saavedra, B. M. Martin, G. Gurrola, P. Héron, and L. Possani. 1992. Amino acid sequence and immunological characterization with monoclonal antibodies of two toxins from the venom of the scorpion *Centruroides noxius* Hoffman. *Eur J Biochem.* 204:281-292

Zenouaki, I., R. Kharrat, J.-M. Sabatier, C. Devaux, H. Karoui, J. Van Rietschoen, M. H. Ayeb and H. Rochat. 1997. *In vivo* protection against *Androctonus australis* Hector scorpion toxin. *Vaccine*. 15:187-194.

Zlotkin, I., M. Eitan, V. P. Bindokas, M. F. Adams, M. Moyer, W. Burkhart and E. Fowler. 1991. Functional duality and structural uniqueness of depressant insect-selective neurotoxins. *Biochemistry* 30:4814-4821.